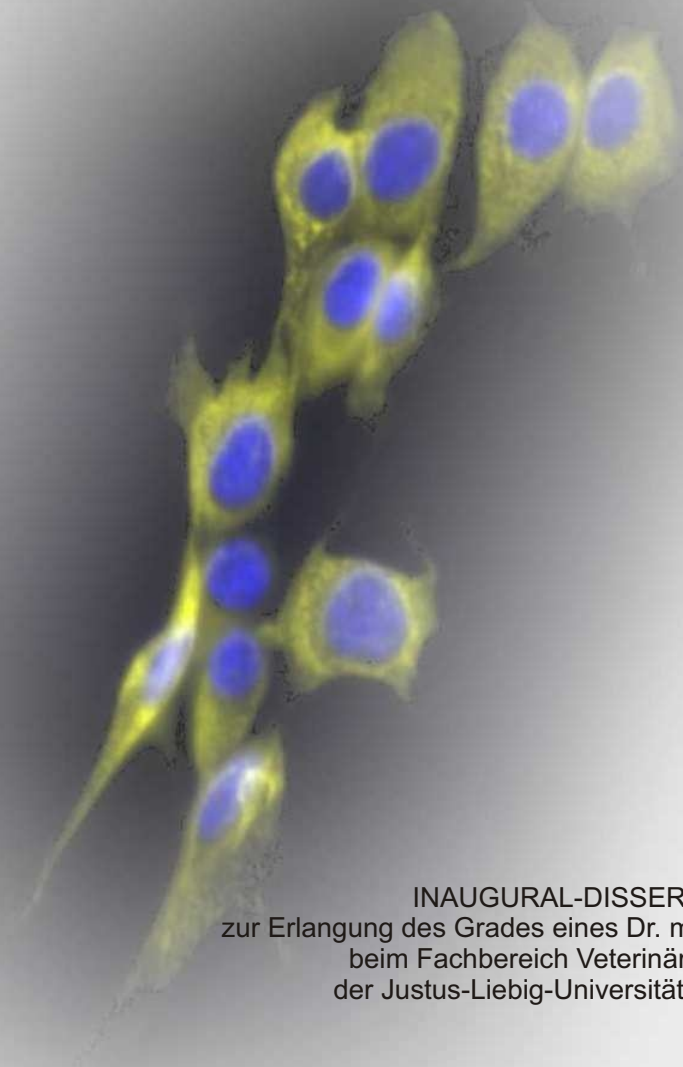


**Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels
Polymerasekettenreaktion und monoklonaler Antikörper**



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Sibilina Cedillo Rosales

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2004

© 2004 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-20-0

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvb.net
www.dvb.net

Aus dem Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Thiel

**Charakterisierung ruminanter Pestiviren mittels
Polymerasekettenreaktion und monoklonaler Antikörper**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Sibilina Cedillo Rosales
Tierärztin aus Cd. del Maiz, S.L.P., Mexiko

Gießen 2004

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Thiel
Prof. Dr. C. Lämmle

Tag der Disputation: 17. Dezember 2004

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt, eingehalten.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Taxonomie und Wirtsspektrum von Pestiviren	1
1.2. Molekularbiologie von Pestiviren	2
1.3. Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal disease (BVD/MD)	5
1.4. Border Disease	7
1.5. Heterogenität ruminanter Pestiviren	7
1.6. Labordiagnostik	9
1.6.1 Indirekter Infektionsnachweis	9
1.6.2. Direkter Infektionsnachweis	10
1.7. BVD/MD Bekämpfungsprogramme	11
1.8. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. MATERIAL	13
2.1.1. Zellen	13
2.1.2. Antikörper	13
2.1.3. Virusstämme	13
2.1.4. Enzyme	15
2.1.5. Seren	15
2.1.6. Oligonukleotide und Sonden	16
2.1.7. Vorgefertigte Medien und Systeme	16
2.1.8. Chemikalien	16
2.1.9. Medien und Puffer	18
2.1.9.1. <u>Medien und Puffer für Zellkultur und Immunfluoreszenz</u>	18
2.1.9.2. <u>Puffer für RT-PCR</u>	20
2.1.9.3. <u>Puffer und Medien für DNS Klonierung und Sequenzierung</u>	21
2.1.9.4. <u>Puffer für Protein-Zellextraktion</u>	22
2.1.9.5. <u>Puffer für Reinigung von Antikörper</u>	22
2.1.9.6. <u>Puffer für SDS-PAGE</u>	22
2.1.9.7. <u>Puffer für PAGE-Färbung</u>	23
2.1.9.8. <u>Puffer für Protein-Transfer auf Nitrozellulosemembran</u>	24
2.1.9.9. <u>Puffer für die Herstellung von Immunaффinitätssäulen</u>	24
2.1.9.10. <u>Puffer für die Reinigung des E2-Proteins</u>	24
2.1.9.11. <u>Puffer für Isotypisierung von Ig (mAk)</u>	25
2.1.9.12. <u>Puffer für Biotinylierung von mAK</u>	25
2.1.9.13. <u>ELISA- Puffer</u>	26
2.1.10. Geräte	26
2.1.11. Genbank-Zugangsnummer	28
2.2. METHODEN	30
2.2.1. Zellkulturtechniken	30
2.2.1.1. Adhärente Säuger-Zelllinien	30
2.2.1.2. Hybridom- und Myelomzellen	30
2.2.1.3. Insektenzellen (SF-21)	30
2.2.1.4. Bestimmung der Zellzahl	30
2.2.1.5. Kryokonservierung von Zellen	31
2.2.2. Isolierung von Pestiviren aus Probenmaterial	31
2.2.3. Vermehrung von Pestivirusisolaten	32
2.2.4. Titration von Pestiviren	32

Inhaltsverzeichnis	Seite
2.2.5. Indirekte Immunfluoreszenz	32
2.2.6. Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	33
2.2.6.1. RNS Präparation	33
2.2.6.2. Diskriminierende BVDV-2 RT-PCR	34
2.2.6.2.1 Auswahl der Primer	34
2.2.6.2.2. Reverse Transkription (RT)	34
2.2.6.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.6.2.4 Analyse der Amplifikationsprodukte	35
2.2.6.3. BVDV-1 spezifische RT-PCR	36
2.2.6.3.1 Auswahl der Primer	36
2.2.6.3.2 RT-PCR und Analyse der Amplifikationsprodukte	37
2.2.7. Real Time RT-PCR	38
2.2.7.1. Auswahl der Primer- und TaqMan® Sonden	38
2.2.7.2. Real time RT-PCR (SYBR-Green)	39
2.2.7.2.1. Reverse Transkription (RT)	39
2.2.7.2.2. Real time PCR (SYBR® Green)	39
2.2.7.3. TaqMan® PCR und Multiplex TaqMan® PCR	41
2.2.8. DNS-Sequenzierung und phylogenetische Analyse	41
2.2.8.1 RT-PCR für N ^{pro} -Gen Sequenz	41
2.2.8.2 RT-PCR für E2-Gen Sequenz	41
2.2.8.3. Isolierung der DNS Fragmente aus Agarosegelen	43
2.2.8.4. Klonierung von DNS Fragmenten	43
2.2.8.5. Minipräparation von Plasmid-DNS	44
2.2.8.6. Spaltungen mit Restriktionsenzymen	44
2.2.8.7. DNS-Sequenzierung	45
2.2.8.8. Auftrennung der DNS im Sequenzgel	45
2.2.8.9. Auswertung der Sequenzdaten	46
2.2.8.10. Phylogenetische Analysen	47
2.2.9. Herstellung monoklonaler Antikörper	47
2.2.9.1. Produktion des rekombinanten Glykoproteins E2	47
2.2.9.2. Extraktion von rekombinantem Glykoprotein E2 aus Insektenzellen	48
2.2.9.3. Bestimmung der Proteinkonzentration (BC-Mikroassay)	48
2.2.9.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
2.2.9.5. Proteinfärbung	49
2.2.9.5.1. Coomassiefärbung von Proteinen	49
2.2.9.5.2. Silberfärbung von Proteinen	49
2.2.9.6. Immunoblot	49
2.2.9.7. Reinigung monoklonaler Antikörper	50
2.2.9.8. Herstellung der Immunoaffinitätsäulen (Kopplung von D5 an Protein G-Sepharose)	50
2.2.9.9. Reinigung des rekombinanten Glykoproteins E2	51
2.2.9.10. Gewinnung monoklonaler Antikörper	52
2.2.9.10.1. Immunisierung von Mäusen	52
2.2.9.10.2. Gewinnung, Konservierung und Ausplattierung von Feeder-Zellen	52
2.2.9.10.3. Gewinnung der Splenozyten (Milzzellen)	55
2.2.9.10.4. Fusion von Splenozyten und Myelomzellen	55
2.2.9.10.5. Selektion von Hybridomzellen	56
2.2.9.10.6. Screening von Hybridomzellen	56

Inhaltsverzeichnis	Seite
2.2.9.10.7. Klonierung positiver Hybridomklone	57
2.2.9.10.8. Produktion von mAk	57
2.2.9.11. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper	58
2.2.9.11.1. Isotypisierung	58
2.2.9.11.2. Test der mAk im Immunoblot	58
2.2.9.11.3. Reaktionsspektrum der mAk mit Pestiviren	59
2.2.9.11.4. Serumneutralisationstest (SNT) mit den gewonnenen mAk	60
2.2.9.11.5. Immunelektronenmikroskopie mit den mAk	60
2.2.9.11.5.1. Gradientenreinigung von Virionen	60
2.2.9.11.5.2. Immunoelktronmikroskopie	61
2.2.9.11.6. Etablierung eines ELISA mit den gewonnenen mAk	61
2.2.9.11.6.1. Biotinylierung von mAk	61
2.2.9.11.6.2. Etablierung eines Antigen-Capture-ELISA für Nachweis und Quantifizierung des E2-Glykoproteins von Pestiviren	62
3. ERGEBNISSE	63
3.1 Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	63
3.1.1. Diskriminierende BVDV-2 RT-PCR	63
3.1.2. BVDV-1 spezifische RT-PCR	64
3.2. Untersuchung von Virusisolaten mittels diskriminierender RT-PCR und BVDV-1 spezifischer RT-PCR	67
3.3. Real Time RT-PCR	69
3.3.1. SYBR [®] Green Real Time PCR	70
3.3.2. TaqMan [®] RT-PCR	73
3.3.2.1. Reaktionsspektrum der TaqMan [®] Sonde PV-Taq01	73
3.3.2.2. Reaktionsspektrum der TaqMan [®] Sonde PV-Taq02	76
3.3.3. Multiplex TaqMan [®] RT-PCR	77
3.4. Untersuchung der genetischen Heterogenität ruminanter Pestiviren	78
3.4.1. Auswahl von Pestivirusisolaten für die phylogenetische Untersuchung	78
3.4.2. Ermittlung der Nukleinsäuresequenz (N ^{pro} und E2) ausgewählter Pestivirusisolate	80
3.4.3. Phylogenetische Analysen auf der Basis von N ^{pro} -Gen Sequenzen	83
3.4.4. Phylogenetische Analysen auf der Basis von E2-Gen Sequenzen	88
3.4.5. Häufigkeitsverteilung der Divergenzen im N ^{pro} -Gen	91
3.5. Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen das Glykoprotein E2 von Pestiviren	93
3.5.1. Produktion des rekombinanten Glykoproteins E2 mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems	93
3.5.2. Reinigung rekombinanter Proteine aus Insektenzellen	94
3.5.3. Immunisierung von Mäusen	97
3.5.4. Fusion von Splenozyten und Myelomzellen; Klonierung und Selektion von Hybridomzellen	97
3.5.6. Charakterisierung gewonnener monoklonaler Antikörper	98
3.5.7. Reaktion der monoklonalen Antikörper im Immunoblot	100
3.5.8. Reaktionsspektrum der monoklonalen Antikörper (Immunfluoreszenz)	104
3.5.9. Serumneutralisationstest (SNT)	112
3.5.10. Immunelektronenmikroskopie	113
3.5.10.1. Dichtegradienten-Reinigung von Virionen	113

Inhaltsverzeichnis	Seite
3.5.10.2. Immunelektronenmikroskopie	114
3.5.11. Etablierung eines ELISA-Systems zum Nachweis und zur Quantifizierung von E2	115
4. DISKUSSION	122
4.1. Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	123
4.2. Heterogenität ruminanter Pestiviren	126
4.3. Gewinnung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen das Glykoprotein E2 von Pestiviren	130
5. ZUSAMMENFASSUNG	135
6. LITERATURVERZEICHNIS	137
7. ANHANG	148

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abb. 1. Wirtsspektrum von Pestiviren	2
Abb. 2. Pestivirionen und Genomorganisation von Pestiviren	3
Abb. 3. Schematische Darstellung der Immunisierung von Mäusen für die Gewinnung monoklonaler Antikörper	54
Abb. 4. Diskriminierende BVDV-2 RT-PCR	65
Abb. 5. Spezifische BVDV-1 RT-PCR	66
Abb. 6. Reaktion der ausgewählten Primer (SYBR [®] Green) und Schmelzprofile der Amplifikate	72
Abb. 7. Reaktionsspektrum der Sonde PV-Taq01	74
Abb. 8. Sensitivität der TaqMan [®] PCR	75
Abb. 9. Sensitivität der TaqMan [®] RT-PCR	75
Abb. 10. Reaktionsspektrum der Sonde PV-Taq02	76
Abb. 11. Multiplex TaqMan [®] RT-PCR	77
Abb. 12. Amplifikation der N ^{pro} -Gen Sequenz	81
Abb. 13. Enzymverdau von Plasmid-Präparationen	81
Abb. 14. Phylogenetischer Stammbaum von Pestiviren (N ^{pro} -Gen)	86
Abb. 15. Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der genetischen Divergenz im E2-Gen	89
Abb. 16. Häufigkeitsverteilung der Divergenzen von 172 N ^{pro} -Gen Sequenzen	92
Abb. 17. E2-Reinigung aus Insektenzellen (SF-21) nach Infektion mit Baculovirus-BVDV Rekombinanten (Immunoblot mit dem mAk D5)	95
Abb. 18. Immunoblot und Silber-Färbung von gereinigtem rE2-Glykoprotein	96
Abb. 19. Gewinnung monoklonaler Antikörper (mAk) (Übersicht)	99
Abb. 20. Immunoblot mit rekombinanten E2-Glykoproteinen	101
Abb. 21. Immunoblot mit rekombinanten E2-Glykoproteinen	102
Abb. 22. Immunoblot mit rekombinantem und authentischem E2-Glykoprotein	103
Abb. 23. Immunfluoreszenz mit dem mAk CODE4 (gegen NS3, Kontrollreaktion) und SCR25	107
Abb. 24. Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR4	107
Abb. 25. Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR4	108
Abb. 26. Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR8	108
Abb. 27. Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR25	109
Abb. 28. Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR48	110
Abb. 29. Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR60	111
Abb. 30. Reaktion der mAk im SNT	112
Abb. 31. Immunelektronenmikroskopie	114
Abb. 32. Verdünnungsreihe der Fängerantikörper	116
Abb. 33. Verdünnungsreihe der Detektionsantikörper	117
Abb. 34. Quantifizierung des rE2 mittels eines etablierte Sandwich-ELISA	118
Abb. 35. Spezifität des Sandwich-ELISA (Zellextrakte infizierter Zellen)	119
Abb. 36. Spezifität des Sandwich-ELISA (virushaltige Kulturüberstände (ÜS))	121

Inhaltsverzeichnis	Seite
Tab. 1. RT-PCR Mixe und Amplifikationsbedingungen für die BVDV-2 diskriminierende RT-PCR	36
Tab. 2. RT-PCR Mixe und Amplifikationsbedingungen für die BVDV-1 spezifische RT-PCR	37
Tab. 3. Master-Mixe und Amplifikationsbedingungen für Real Time RT-PCR (SYBR-Green, TaqMan®PCR und Multiplex TaqMan®PCR)	40
Tab. 4. Primer für das N ^{pro} - und E2-Gen	42
Tab. 5. RT-PCR Mixe und Amplifikationsbedingungen für Amplifikation des N ^{pro} -Gens bzw. des E2-Gens	42
Tab. 6. Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die DNS-Sequenzierung	46
Tab. 7. Pestivirus-Isolate, die mit verschiedenen Methoden untersucht wurden	67
Tab. 8. Klassifizierung von Pestiviren aus deutschen Rinderbeständen mittels RT-PCR (Isolate)	68
Tab. 9. Klassifizierung von Pestiviren aus deutschen Rinderbeständen mittels RT-PCR (Bestände)	68
Tab. 10. Reaktionsspektrum von Primern (SYBR®Green) und Sonden in der SYBR®Green und TaqMan® RT-PCR	71
Tab. 11. Tabellarische Auflistung der sequenzierten Pestivirusisolate	82
Tab. 12. Eigenschaften der ausgewählten Hybridome	100
Tab. 13a. Reaktionsspektrum der gewonnenen mAk	105
Tab. 13b. Reaktionsspektrum der gewonnenen mAk	106
Tab. 14. Tabellarische Auflistung der im ELISA verwendeten Pestivirusisolate	119

ABKÜRZUNGEN

α	anti
A	Adenin-Base
Abb.	Abbildung
ABDB-A	"Antibody dilution buffer"
ABTS	"2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)"
AcNPV	<i>Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus</i>
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aq dd	doppelt deionisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
B-Ly	B-Lymphozyten
BC	Bicinchoninsäure
BDV	<i>Border Disease Virus</i>
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BVDV	<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i>
C	Cytosin-Base
°C	Grad Celsius
CCM	"Cell Culture Medium"
cDNA (cDNS)	komplementäre Desoxiribonukleinsäure
CIAP	Alkalische Phosphatase ("calf intestinal alkaline phosphatase")
cm	Zentimeter
CSFV	<i>Classical Swine Fever Virus</i>
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
dTTP	Desoxythimidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidphosphat
defiz.	defizient

DEPEC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle Medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (DNS)	Desoxiribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Na ₂ Salz
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
EtOH	Ethanol
EG	Europäische Gemeinschaft
EM	Elektronenmikroskop
Fa.	Firma
FBS	Foetales bovines Serum
G	Guanin-Base
g	Gramm
gp	Glykoprotein
GCG	"Genetic Computer Group"
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAT	H ypoxanthin, A minopterin, T hymidin
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HT	H ypoxanthin, T hymidin
H ₂ O	Wasser
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunoglobulin(e)
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IT	Infektiositätstest
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
KSPV	s. CSFV
l	Liter

ABKÜRZUNGEN

M	molar
m	milli
μ	mikro
m.o.i.	"multiplicity of infection"
mAk	monoklonale(r) Antikörper
MBG	"minor groove binder"
Min.	Minute(n)
mRNS	"messenger" RNS
N	normal
nAk	neutralisierende Antikörper
nzp	nicht zytopathogen
ND ₅₀	50% Neutralisationsdosis
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminotermminus
NS (P)	Nicht-Struktur(protein)
NT	Neutralisationstest
NTR	nicht-translatierte Region
OD	optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin
ORF	offener Leserahmen "Open Reading Frame"
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ("phosphate buffered saline")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion "Polymerase Chain Reaction"
PFA	Paraformaldehyd
pfu	"plaque forming unit"
pI	persistente infiziert
PO	Meerrettichperoxidase
R	Nukleotide A oder G
rE2	rekombinantes E2-Glykoprotein
RNase	Ribonuklease
RNS (RNA)	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion

SDS	Natriumdodecylsulfat ("Sodiumdodecylsulfat")
Sek.	Sekunde(n)
SNT	Serumneutralisationstest
SP	Strukturprotein(e)
ssRNS	einzelsträngige RNS
T	Thymin-Base
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
TCID ₅₀	"50% tissue culture infectious dose"
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheiten "Units"
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
ÜS	Überstand
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
W	Watt
WT	Wildtyp
Y	Nukleotide C oder T
zp	zytopathogen
zpE	zytopathischer Effekt
ZNS	Zentralnervensystem

1. EINLEITUNG

1.1. Taxonomie und Wirtsspektrum von Pestiviren

Pestiviren werden weltweit als Erreger ökonomisch bedeutender Infektionskrankheiten von Nutztieren betrachtet. Die taxonomische Einteilung der Pestiviren wurde zuerst auf Basis der Wirtstierspezies durchgeführt, aus denen sie isoliert wurden, und zwar in das Virus der klassischen Schweinepest (KSPV), das Virus der bovinen Virusdiarrhö (BVDV) und das Border Disease Virus der Schafe (BDV). Die beiden zuletzt genannten (BVDV, BDV) werden als ruminante Pestiviren bezeichnet. Der Nachweis von Pestiviren, die sich genetisch und antigenetisch von den bereits bestehenden drei Spezies klar abgrenzen liessen, führte zur Etablierung einer weiteren Pestivirusspezies (BVDV-2). Letztere waren im Zusammenhang mit einer epidemisch verlaufenden Erkrankung bei Rindern in Nordamerika isoliert worden, bei der u.a. Thrombozytopenie und massive Hämorrhagien in inneren Organen und in der Subcutis auftraten (Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 1994; Tijssen et al., 1996). Die derzeit gültige Nomenklatur der Pestiviren wurde durch das ICTV (*International Committee for Taxonomy of Viruses*) festgelegt. Demnach bildet das Genus *Pestivirus* zusammen mit den Genera *Flavivirus* und *Hepacivirus* die Familie *Flaviviridae*. Das Genus *Pestivirus* umfasst als Spezies KSPV, BVDV-1, BVDV-2 und BDV. Ein Isolat aus einer Giraffe wurde als mutmaßliche fünfte Spezies in dieses Genus aufgenommen (Heinz et al., 2000).

Das Wirtsspektrum ruminanter Pestiviren ist sehr breit. Im Gegensatz zum KSPV, das nur bei Wild- und Hausschweinen vorkommt (Laddomada, 2000), wurden BVDV-1 und BVDV-2 bei unterschiedlichen Haus- und Wildwiederkäuern sowie Schweinen nachgewiesen (Baule et al., 1997; Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b; Paton et al., 1995; Thiel et al., 1996; Vilcek et al., 1997). BDV wurde aus Schafen und Schweinen isoliert (Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b; Dekker et al., 1995; Vilcek und Belak, 1996). Somit gibt es bei ruminanten Pestiviren keine eindeutige Einteilung auf Grundlage der Wirtsspezies (Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b; Thiel et al., 1996; Vilcek et al., 1997). Ferner wurden Pestiviren, die sich keiner bekannten Pestivirusspezies eindeutig zuordnen lassen, aus Wildwiederkäuern isoliert. Das Isolat Giraffe-1 stammt aus einer afrikanischen Giraffe; möglicherweise zirkulieren ähnliche Viren in afrikanischen Wiederkäuern (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 1997; Becher et al., 2003). 1996 wurde je ein Virus aus einem Rentier und einem Bison aus dem Zoo in Duisburg isoliert

(Reindeer-1 und Bison-1). Phylogenetische Analysen auf der Basis von Nukleinsäuresequenzen zeigten, dass es sich bei diesen Isolaten möglicherweise um Vertreter einer neuen Pestiviruspezies handelt, die Ähnlichkeiten mit BDV aufweist (Abb. 1) (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 1999b).

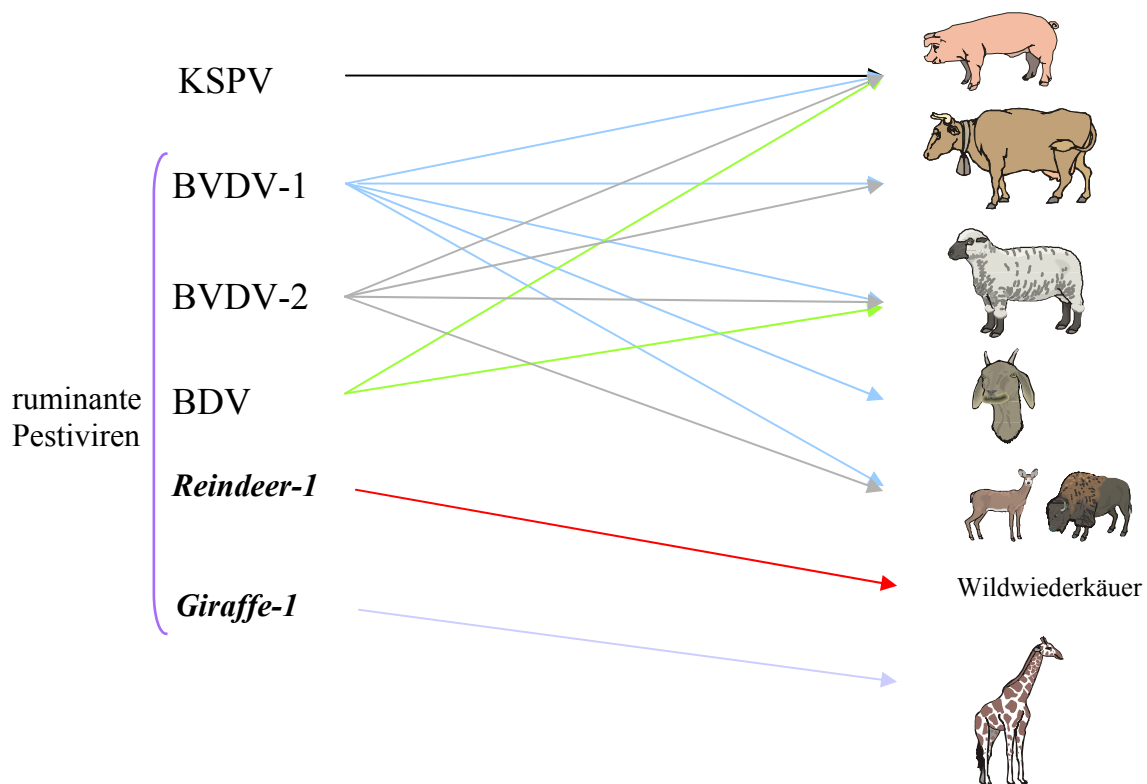


Abb. 1: Wirtsspektrum von Pestiviren. KSPV: Virus der klassischen Schweinepest; BVDV-1: Virus der bovinen Virusdiarrhoe 1; BVDV-2: Virus der bovinen Virusdiarrhoe 2; BDV: Border Disease Virus der Schafe (BDV).

1.2. Molekularbiologie von Pestiviren

Das Genom der Pestiviren besteht aus einer einzelsträngigen Ribonukleinsäure positiver Polarität (+ssRNS) mit einer Größe von ca. 12.3 kB. Das Genom enthält einen offenen Leserahmen ("Open Reading Frame", ORF), der von nicht translatierten Regionen (5' NTR und 3' NTR) flankiert wird. Die NTR-Bereiche enthalten wichtige Signale für die Replikation des Virusgenoms und die Synthese der Virusproteine. Der ORF kodiert für ein Polyprotein von ca. 4000 Aminosäuren. Dieses Polyprotein wird co- und posttranslational durch virale und zelluläre Enzyme in die reifen Virusproteine (11-12 Proteine) gespalten

(Abb. 2) (Collett et al., 1988b; Meyers und Thiel, 1996; Tautz et al., 1997; Thiel et al., 1992).

Die 5'-terminale Region des ORF kodiert die N-terminale Protease (N^{pro}), die sich autokatalytisch von dem Polyprotein abspaltet. In 3' Richtung folgen Gene für die Strukturproteine: das Kapsidprotein (C) und die Hüllglykoproteine E^{rns} , E1 und E2 (E steht für "*envelope*" (Hülle) und $^{\text{rns}}$ für *RNase secreted* (sezernierte Ribonuklease)) (Meyers und Thiel, 1996; Rümenapf et al., 1993). Das Kapsidprotein bildet zusammen mit der viralen RNS das Core, das von einer Lipidmembran umgeben ist; letztere enthält die viralen Glykoproteine. Virionen weisen eine Größe zwischen 40 und 60 Nanometern auf (Abb. 2) (Meyers und Thiel, 1996).

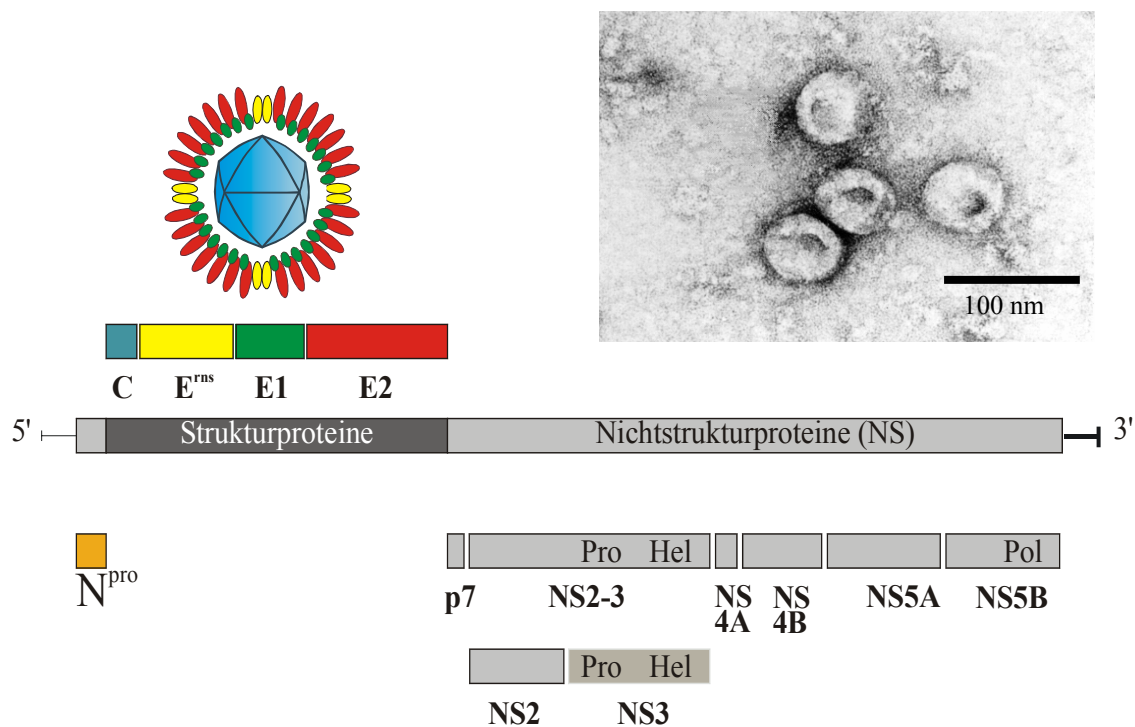


Abb. 2: Pestivirionen und Genomorganisation von Pestiviren. Oben links: Strukturproteine mit Virusmodell; Oben rechts: Elektronenmikroskopisches Bild von Pestiviren; Mitte: Genom mit nicht translatierten Regionen; Unten: Nichtstrukturproteine (Pro - Protease; Hel - Helikase; Pol - RNS abhängige RNS Polymerase).

Das Glykoprotein E2 induziert nach Infektion oder Impfung die Bildung neutralisierender Antikörper, die eine wichtige Rolle bei der Induktion einer protektiven Immunantwort spielen (König et al., 1995; Tijssen et al., 1996; Weiland et al., 1990). Das Glykoprotein

E^{ns} induziert in geringerem Ausmaß ebenfalls neutralisierende Antikörper (König et al., 1995; Weiland et al., 1992; Windisch et al., 1996). Die molekulare Klonierung der Pestivirusgene (Rümenapf et al. 1991; van Rijn et al. 1996) und die Eigenschaft des E^{ns}, Antikörper nach natürlicher Infektion von Schweinen zu induzieren, wurden für die Entwicklung markierter Impfstoffe gegen die klassische Schweinepest eingesetzt. Verfügbare Markervakzinen basieren auf dem rekombinanten E2-Glykoprotein. Werden hingegen Antikörper gegen E^{ns} bei einem Tier nachgewiesen, so hat eine Infektion mit einem Feldvirus stattgefunden (Bouma et al., 1999; Bouma et al., 2000; Depner et al., 2001; Dewulf et al., 2000; Floegel-Niesmann, 2001; Uttenthal et al., 2001; van Rijn et al., 1999). Das E^{ns} weist eine für ein virales Glykoprotein bemerkenswerte enzymatische Funktion (Ribonuklease) auf (Windisch et al., 1996) und tritt außerdem als freies Protein im Überstand infizierter Zellen sowie im Serum und Plasma infizierter Tiere auf. Die Detektion von E^{ns} im Serum und/oder Plasma ist Grundlage einiger kommerziell verfügbarer ELISA-Systeme zum Nachweis einer Pestivirusinfektion.

Der 3' terminale Bereich des ORF kodiert für die Nichtstrukturproteine (NS): p7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B (Abb. 2) (Meyers und Thiel, 1996). Einige Funktionen der NS-Proteine konnten bereits aufgeklärt werden. So besitzt das NS3 eine Proteasefunktion, welche die Spaltung zwischen NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B katalysiert (Ryan et al., 1998; Tautz et al., 1997; Tautz et al., 2000). NS4A stellt einen Kofaktor für die NS3-Protease dar (Tautz et al., 2000). NS5B schließlich ist die virale RNS-abhängige RNS-Polymerase (Abb. 2) (Meyers et al., 1989).

Das NS3-Protein ist in Pestiviren hoch konserviert und induziert nach einer Infektion die Produktion von Antikörpern. Diese Eigenschaft wurde für die Produktion monoklonaler Antikörper benutzt, die in der Labordiagnostik für den Nachweis von Pestiviren eingesetzt werden (Dubovi, 1990).

Pestiviren kommen in Form zweier Biotypen vor, die sich im Hinblick auf die Auswirkungen ihrer Vermehrung in Zellkulturen unterscheiden lassen. Nicht zytopathogene (nzp) Pestiviren replizieren ohne sichtbare Veränderung der Zielzellen. Im Gegensatz dazu führt eine Infektion mit zytopathogenen (zp) Pestiviren zur Lyse infizierter Zellen (Meyers und Thiel, 1996). Nach einer Infektion mit zp Viren ist neben dem NS2-3 Protein auch eine erhebliche Menge des NS3 Proteins nachweisbar, während sich NS3 nach einer Infektion mit nzp Viren nicht nachweisen lässt. NS3 gilt daher auch als Markerprotein für zytopathogene Pestiviren. Bei der tödlich verlaufenden Mucosal Disease

(MD, s.u.) treten Pestiviren beider Biotypen in einem betroffenen Tier auf und werden als Viruspaar bezeichnet (Becher et al., 2001b; Bruschke et al., 1998a; McClurkin et al., 1985; Moennig und Greiser-Wilke, 2003; Tautz et al., 1998).

1.3. Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal disease (BVD/MD)

Das BVD-Virus wurde erstmals 1946 in den USA im Zusammenhang mit einer akuten, übertragbaren Gastroenteritis und niedriger Letalität bei Rindern beschrieben (Olafson, 1946). Sieben Jahre später schilderten Ramsey und Chivers eine Krankheit bei Rindern mit schweren Läsionen im Verdauungstrakt und hoher Letalität, aber niedriger Morbidität, die als "Mucosal Disease" (MD) bezeichnet wurde (Ramsey und Chivers, 1953). Heute zählt BVDV/MD weltweit zu den wirtschaftlich bedeutendsten Viruskrankheiten des Rindes (Houe, 1999). Allein in Deutschland beträgt die Seroprävalenz von BVDV in der Rinderpopulation zwischen 60 und 90% (Becher et al., 2001b; Moennig et al., 2003). BVDV wird horizontal und vertikal übertragen. Das Virus wird über Körpersekrete (Kot, Speichel u.a.) ausgeschieden und meist oronasal aufgenommen. Weitere Quellen für eine horizontale Übertragung sind der Samen infizierter Bullen und kontaminierte Vakzinen. Die vertikale Übertragung erfolgt u.a. durch diaplazentare Infektion (Thiel et al., 1996). Die Infektion immunkompetenter, nicht tragender Rinder verläuft häufig klinisch inapparent oder führt zu milden Erkrankungen (Evermann und Ridpath, 2002; Thiel et al., 1996). Nach der primären Virusvermehrung in Epithelzellen des Oropharynx und regionalen lymphatischen Geweben folgt eine Virämie und die Infektion verschiedener Organe und Gewebe (insbesondere lymphatischer Gewebe, Epithelzellen des Verdauungstraktes und Respirationstraktes) (Bruschke et al., 1998b). Als klinische Symptome können u.a. Fieber, Depression, Anorexie, Diarrhö, Erosionen oder Ulzerationen im Verdauungstrakt, respiratorische Erkrankungen, Fruchtbarkeitsstörungen und verminderte Samenqualität beobachtet werden (Becher et al., 2001b; Flores et al., 2000; Thiel et al., 1996).

Ende 1980 wurde in Nordamerika eine akute Erkrankung bei Kälbern beschrieben, die in Zusammenhang mit Infektionen durch BVDV gebracht wurde und zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten führte. Eine charakteristische ausgeprägte Thrombozytopenie und massive Hämorrhagien an inneren Organen und Schleimhäuten führten zur Namensgebung als hämorrhagisches Syndrom (HS) (Corapi et al., 1989; Corapi et al., 1990). Bei mehreren Fällen isolierte man nzp BVD-Viren, die später genetisch und

antigenetisch charakterisiert wurden. Diese Pestiviren unterschieden sich eindeutig von den vorher bekannten Pestivirusspezies (BVDV, BDV, KSPV) und wurden als BVDV-2 bezeichnet (Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b; Deregt et al., 1998; Flores et al., 2000; Flores et al., 2002; Ridpath und Bolin, 1995; Ridpath et al., 2000; Stoffregen et al., 2000).

Infektionen mit nzp BVD-Virus haben bei tragenden Tieren in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Infektion in der Trächtigkeit verschiedene Auswirkungen. So kann eine Infektion im ersten Monat der Trächtigkeit zur Resorption führen. Missbildungen (Augen und Gehirn), Aborte, Totgeburten und Geburten lebensschwacher Kälber können nach Infektionen zwischen dem 50. und 200. Tag der Gravidität vorkommen (Thiel et al., 1996; Van Oirschot, 1983). Die diaplazentare Übertragung zwischen dem 40. und 120. Tag der Trächtigkeit kann zur Entstehung persistierender Infektionen des Fetus führen. Das Immunsystem des Fetus ist in diesem Zeitraum noch nicht entwickelt, es entsteht eine erworbene spezifische Immuntoleranz. Betroffene Tiere bleiben nach der Geburt lebenslang persistent infiziert (pI-Tiere) (Dubovi, 1994; McClurkin et al., 1984; Scherer et al., 2001; Van Oirschot, 1983). Persistent infizierte Tiere sind von zentraler Bedeutung für die BVDV-Epidemiologie. Sie scheiden das Virus lebenslang aus und bilden ein BVDV-Reservoir in der Rinderpopulation. Etwa 1-2% der gesamten Rinderpopulation in Deutschland ist persistent infiziert (Becher et al., 2001b; Moennig und Greiser-Wilke, 2003). Eine persistierende Infektion mit dem BVD-Virus ist darüber hinaus Voraussetzung für die tödlich verlaufende Mucosal Disease. Die Mucosal Disease (MD) tritt nur bei pI-Tieren meist im Alter zwischen 6 und 24 Monaten auf. Eine niedrige Morbidität und eine hohe Letalität sind charakteristisch für MD. Bei akuter MD sterben die Tiere innerhalb von zwei Wochen nach Auftreten der ersten Symptome. Nur in Ausnahmefällen entwickelt sich ein chronischer Verlauf. Klinische Symptome sind Fieber, Anorexie, Lethargie, Nasenausfluss, hochgradige z.T. blutige Diarrhö und Dehydratation. Im Verdauungstrakt werden Ulzerationen und Nekrosen und die Zerstörung der lymphatischen Gewebe beobachtet. Aus Tieren mit MD kann zusätzlich zu dem nzp Virus stets zp Virus isoliert werden (Viruspaar, s.o.)(Becher et al., 2001b; Tautz et al., 1998). Diese zp Viren entstehen hierbei meist de novo durch Mutation aus den im pI-Tier zirkulierenden nzp Viren. Durch molekulare Analyse von Viruspaaren konnten verschiedenen Mutationen, die zur Entstehung von zp-BVDV führen, nachgewiesen und charakterisiert werden. Dabei handelt es sich u.a. um die Insertion zellulärer Nukleinsäuresequenzen sowie Duplikationen,

Deletionen oder Punktmutationen im viralen Genom (Baroth et al., 2000; Becher, et al., 1998b; Meyers und Thiel, 1996; Tautz et al., 1993; Thiel et al., 1996). Die Superinfektion eines pI-Tieres mit einem zp Virus, z.B. als Folge einer Impfung mit Lebendvakzinen, kann ebenfalls zur MD führen (Becher et al., 1999a).

1.4. Border Disease

Die "*Border Disease*" wurde erstmal an der Grenze zwischen England und Wales bei Schafen beschrieben (Hughes et al., 1959). In Neuseeland, Australien und in den USA wurde die Erkrankung später als "*hairy shaker disease*" bezeichnet (Thiel et al., 1996). BDV ist weltweit verbreitet und in Ländern mit intensiver Schafhaltung von wirtschaftlicher Bedeutung. Akute, postnatale Infektionen verlaufen meist subklinisch oder führen zu milden Erkrankungen (Lethargie, Fieber, Leukopenie u.a.) sowie zur Ausbildung virusneutralisierender Antikörper (Meyers und Thiel, 1996; Thiel et al., 1996). Intrauterine Infektionen sind wie bei BVDV von besonderer Bedeutung und können zu Aborten, Mißbildungen ("*hairy shaker disease*": Zentralnervöse Störungen, Veränderungen des Haarkleides, Tremor und Ataxie) und zur Geburt von pI-Tieren führen (Meyers und Thiel, 1996; Thiel et al., 1996). BDV kommt häufig in Form von nzp Viren vor, aber auch zp Viren wurden isoliert (Becher et al., 1996). Neben BDV wurden auch BVDV-1 und BVDV-2 bei Schafen mit Krankheitssymptomen sowie bei pI-Tieren isoliert (Becher et al., 1994; Vilcek et al., 1997). Auch ein der MD ähnliches Syndrom wurde bei Schafen beschrieben (Barlow et al., 1983).

1.5. Heterogenität ruminanter Pestiviren

Wichtige Kriterien zur Unterscheidung und Eingruppierung von Pestiviren sind ihre genetische und antigenetische Verwandtschaft. Die genetische Verwandtschaft von Pestiviren wird nach Bestimmung von Nukleinsäuresequenzen über phylogenetische Analysen ermittelt. Durch solche Untersuchungen entstand in den letzten Jahren ein komplexes Bild der genetischen Vielfalt der Pestiviren, das sich durch hinzukommende Sequenzinformationen stetig erweitert. Seit der ersten molekularen Klonierung eines Pestivirus wurden zahlreiche komplette Pestivirussequenzen und Teilsequenzen ermittelt.

Mittlerweile sind Teilsequenzen von mehr als 1000 Pestivirusisolaten verfügbar (Baule et al., 1997; Becher et al., 1994; Becher et al., 1995; Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b; Collett et al., 1988a; De Moerlooze et al., 1993; Deng und Brock, 1992; Meyers et al., 1989; Moormann et al., 1990; Ridpath und Bolin, 1994; Ridpath et al., 1997; Vilcek et al., 1997; Vilcek et al., 2001).

Phylogenetische Analysen können auf Basis der kompletten Nukleinsäuresequenzen (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 1998a; Ridpath und Bolin, 1995; Ridpath und Bolin, 1997) oder von Teilsequenzen erstellt werden. Häufig werden solche Analysen auf Basis von Sequenzen des 5' NTR-Bereiches durchgeführt, die sich schnell und einfach bestimmen lassen. Durch solche Analysen lassen sich Pestivirusspezies eindeutig unterscheiden (Beer et al., 2002; Flores et al., 2000; Harpin et al., 1995; Jones et al., 2001; Ridpath et al., 1994; Vilcek et al., 1997; Wolfmeyer et al., 1997). Für eine weitergehende phylogenetische Charakterisierung von Pestiviren sind größere Genomabschnitte des ORF besonders geeignet. Analysen auf Basis des kompletten N^{pro}- oder E2-Gens führen zu einer statistisch signifikanten Einteilung von Pestiviren in Subgruppen innerhalb einer Pestivirusspezies (Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b; Becher et al., 2003; Tijssen et al., 1996). Die größte Zahl der Subgruppen weist BVDV-1 auf; hier sind bis zu 11 Subgruppen beschrieben worden (Vilcek et al., 2001). Bei BVDV-2, BDV-1, und KSPV sind jeweils 2 Subgruppen beschrieben worden (Becher et al., 1999b; Becher et al., 2003). Außerdem wurden zwei weitere Gruppen von Virusisolaten aus Schafen und Wildwiederkäuern identifiziert, die sich von den etablierten Spezies klar unterscheiden lassen und eine enge Verwandtschaft mit BDV aufweisen und als BDV-2 bzw. BDV-3 bezeichnet wurden (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 1999b; Becher et al., 2003).

Die genetische Vielfalt spiegelt sich in der antigenetischen Variabilität von Pestiviren wieder. Signifikante antigenetische Unterschiede wurden mittels Neutralisationstest zwischen den Spezies bzw. Gruppen BVDV-1, BVDV-2, KSPV, BDV-1, BDV-2, und Giraffe-1 ermittelt (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 2003; Dekker et al., 1995). Innerhalb einer Pestivirusspezies wurden signifikante antigenetische Unterschiede zwischen Subgruppen von BVDV-1 gefunden (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 2003; Nagai et al., 2001).

1.6. Labordiagnostik

Die Labordiagnostik von BVDV Infektionen kann indirekt über den Nachweis antiviraler Antikörper sowie direkt über den Nachweis des Virus oder viraler Bestandteile (Proteine, Ribonukleinsäure) erfolgen (Sandvik, 1999). Neben klassischen virologischen Verfahren wie Serumneutralisationstest (SNT) und Virusanzucht in Zellkulturen haben moderne Methoden wie ELISA und Polymerasekettenreaktion (PCR) eine zunehmende Bedeutung erlangt (Schelp und Greiser-Wilke, 2003).

1.6.1 Indirekter Infektionsnachweis

Der Serumneutralisationstest (SNT) wird als sensitives und spezifisches Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen Pestiviren verwendet. Trotz des vergleichsweise großen Zeit- und Arbeitsaufwandes, der einen Einsatz in der Massendiagnostik ausschließt, gilt der SNT als "Gold-Standard" für den Antikörpernachweis (Schelp und Greiser-Wilke, 2003; The OIE, 2000; Thiel et al., 1996). Ausgeführt als Kreuzneutralisationstest eignet sich der SNT auch zur Unterscheidung von Antikörpertitern, die durch unterschiedliche Pestiviren z.B. BVDV-1 und BVDV-2 induziert werden. Durch Einsatz definierter Antiseren lässt sich mittels Kreuzneutralisation die antigenetische Verwandtschaft zwischen Pestivirusisolaten bestimmen (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 2001b; Becher et al., 2003; Nagai et al., 2001)

Für die Routinediagnostik werden heute zahlreiche kommerziell erhältliche Enzymimmunoassays ("Enzyme-linked immunosorbent assays", ELISA) eingesetzt. ELISAs liefern innerhalb weniger Stunden Ergebnisse und sind als automatisierbare Tests für die Massendiagnostik geeignet. Sie ermöglichen den Antikörpernachweis aus unterschiedlichen Probenmaterialien wie Serum, Plasma und Milch (Canal et al., 1998; Kramps et al., 1999; Sandvik, 1999; Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Allerdings erreichen nicht alle ELISAs die Sensitivität und Spezifität des SNT. In Beständen, in denen nicht geimpft wird, lässt sich der Antikörpernachweis mittels SNT oder ELISA zur Ermittlung des Infektionsstatus der Herde einsetzen (Becher et al., 2001b; Schelp und Greiser-Wilke, 2003). Hierbei spielt insbesondere die Untersuchung von Jungtieren mit einem Alter zwischen 6 bis 24 Monaten eine Rolle.

1.6.2. Direkter Infektionsnachweis

Der Nachweis von infektiösem Virus durch Anzucht in der Zellkultur gilt als besonders sensitiv und als "*Gold-Standard*" für den direkten Infektionsnachweis (The OIE, 2000; Thiel et al., 1996). Der Nachweis von Pestivirusantigen in Zellkulturen kann dabei mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz oder Immunperoxidaseverfahren erfolgen. Negative Auswirkungen auf diese Methode haben toxische Substanzen sowie neutralisierende Antikörper im Probenmaterial (The OIE, 2000; Thiel et al., 1996).

ELISA-Systeme wurden auch für die Detektion viraler Proteine (BVD-Virus Antigen u.a.) in Blutproben entwickelt. Für "Antigen-Capture" ELISAs wurden häufig monoklonale oder polyklonale Antikörper eingesetzt, die gegen das NS3-Protein gerichtet sind. Der Nachweis des gebundenen Proteins erfolgte je nach Testsystem mit enzymmarkierten monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern. Die genannten Testverfahren erforderten die Gewinnung von Leukozyten aus gerinnungsgehemmten Blutproben (Entrican et al., 1995; Fenton et al., 1991; Mignon et al., 1991; Shannon et al., 1991). Ein neues einfaches ELISA-System wurde vor kurzem entwickelt. In diesem ELISA wird das E^{ns}-Protein nachgewiesen, welches bei infizierten Tieren als freies Protein in Plasma, Serum und Milch vorkommt. Der Einsatz von ELISAs bietet sich vor allem in Gebieten mit einer hohen Seroprävalenz an, wenn im Rahmen von BVD-Bekämpfungsprogrammen auf einen Schutz der Bestände durch Impfung nicht verzichtet werden soll. Positive Ergebnisse müssen mit anderen Methoden (RT-PCR oder Virusisolierung u.a.) zwei bis drei Wochen nach der ersten Untersuchung bestätigt werden (Sandvik, 1999; Schelp und Greiser-Wilke, 2003).

Ein weiteres Verfahren, das vor allem durch seine Sensitivität und Geschwindigkeit überzeugt, ist die reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Hierbei werden definierte Fragmente des BVD-Virusgenoms im Probenmaterial nachgewiesen. Die RT-PCR hat im Vergleich mit Virusisolierung und Antigennachweis meist eine höhere Empfindlichkeit und lässt sich auch zur Untersuchung von Proben verwenden, die in der Zellkultur oder in ELISAs nicht einsetzbar sind (Horner et al., 1995; Ridpath et al., 2002). Zahlreiche RT-PCR Protokolle wurden für den Nachweis von Pestiviren etabliert (Radwan et al., 1995). Neben den klassischen Untersuchungsmaterialien zum Infektionsnachweis am Einzeltier wie Blutproben, Tupferproben, Organproben etc. wurden auch Samenproben, Impfstoffe, Embryonen und Serum, das in der Zellkultur eingesetzt wird, mittels RT-PCR

untersucht (Audet et al., 2000; Givens et al., 2001; Moennig und Greiser-Wilke, 2003; Stringfellow et al., 2000; Studer et al., 2002). Weiterhin eignet sich diese Methode zur Diskriminierung zwischen Pestiviruspezies (Canal et al., 1996; Letellier et al., 1999; Ridpath und Bolin, 1998; Vilcek et al., 1994; Vilcek et al., 1997) und zur Amplifikation definierter Genomfragmente, die für eine Nukleinsäuresequenzierung eingesetzt werden sollen (Becher et al., 1994; Becher et al., 1995; Ridpath et al., 1994).

Eine relativ neue Modifikation des Verfahrens ist die real time PCR. Hierbei wird die Amplifikation von definierten Genomfragmenten mittels computerunterstützter Messung von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit erfasst. Ein weiterer Vorteil der real time PCR ist die Verringerung von Kontaminationsmöglichkeiten (Bhudevi und Weinstock, 2001; Bhudevi und Weinstock, 2003; McGoldrick et al., 1998; Studer et al., 2002).

1.7. BVD/MD Bekämpfungsprogramme

Zentraler Bestandteil von Bekämpfungsprogrammen gegen BVD/MD ist die Erkennung und Eliminierung persistent infizierter Tiere (Bitsch et al., 2000; Lindberg und Alenius, 1999). In Deutschland hat das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten "Leitlinien für den Schutz von Rinderbeständen vor einer Infektion mit dem Virus der BVD/MD und die Sanierung infizierter Bestände" herausgegeben [Bundesministerium für Ernährung, 1998]. Hiernach wird zunächst durch serologische Untersuchungen der Status eines Bestandes festgestellt. In anschließenden virologischen Bestandsuntersuchungen steht auch hier die Erkennung und Eliminierung von pI-Tieren im Vordergrund (Gaede et al., 2003; Rossmanith et al., 2001). Zusätzlich sind Impfungen mit inaktivierten Viren und/oder mit vermehrungsfähigen Viren wichtiger Bestandteil der Leitlinien. Wesentliches Ziel des Einsatzes von Impfstoffen ist die Verhinderung der diaplastaren Übertragung des Virus (fetaler Schutz) und damit das Vermeiden der Entstehung von pI-Tieren (van Oirschot et al., 1999). Bisher in Deutschland zugelassene Vakzinen beruhen auf BVDV-1a oder -1b Stämmen (Becher et al., 2001b; Beer und Wolf, 2003). Diese Vakzinen vermitteln einen partiellen Schutz gegen Krankheiten die von BVDV-2 induziert werden. Unklar ist bisher, inwieweit die Impfung mit nur einem BVDV-1-Stamm eine anhaltend belastbare Immunität gegenüber systemischen Infektionen mit Vertretern anderer BVDV-1 Subgruppen induziert (Becher et al., 2001b; Reddy et al., 1995).

1.8. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Heterogenität von Pestiviren hat wichtige Auswirkungen auf die Labordiagnostik und die Entwicklung von Impfstoffen. Bei dem Einsatz von modernen Diagnoseverfahren mit hoher Spezifität muss sichergestellt werden, dass alle vorkommenden Pestiviren erfasst werden. Dies gilt insbesondere für den Einsatz monoklonaler Antikörper zum Nachweis viraler Antigene und die Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide bei der Detektion viraler RNS mit Hilfe der RT-PCR oder real time RT-PCR.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genetische und antigenetische Heterogenität von Pestivirusisolaten insbesondere aus Deutschland zu untersuchen und einen Beitrag zur Verbesserung diagnostischer Nachweisverfahren zu leisten. Im ersten Teil der Arbeit standen der Nachweis und die Unterscheidung von Virusisolaten mit Hilfe der RT-PCR im Vordergrund. Ziel war es, Verfahren zu etablieren, die den spezifischen Nachweis einer möglichst breiten Palette von Virusisolaten gewährleisten und gleichzeitig eine Differenzierung zwischen BVDV-1 und BVDV-2 erlauben. Neben der konventionellen RT-PCR wurde hierfür auch die real time RT-PCR eingesetzt. Weiterhin sollten Nukleinsäureteilsequenzen ausgewählter Virusisolate erstellt und für phylogenetische Analysen eingesetzt werden, um einen Überblick über das Vorkommen von Vertretern aus unterschiedlichen Pestivirussubgruppen zu erhalten.

Im zweiten Teil der Arbeit stand die Untersuchung der antigenetischen Heterogenität von Pestiviren im Vordergrund. Hierzu sollten monoklonale Antikörper (mAk) gegen das Glykoprotein E2 von BVDV-1 und BVDV-2 gewonnen werden. Nach der Charakterisierung der erhaltenen mAks sollten diese u.a. zur Unterscheidung von Virusisolaten verwendet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Zellen

MDBK: *Bos taurus*, “Madin Darby bovine kidney” Zellen: American Type Culture Collection (ATCC CCL-22).

PK-15: “*Porcine kidney*” Zellen: American Type Culture Collection (ATCC CCL-33).

SFT-R: “*Sheep fetal thymus*” SFT-R/CCL5 Rie043 Zellen: von Dr. Riebe (Institut für Diagnostische Virologie, BFAV, Insel Riems, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Antikörper

Code 4: muriner monoklonaler Antikörper (mAk) 8.12.7 gegen NS3 von Pestiviren, erhalten von Dr. E. J. Dubovi (Cornell University, Ithaca, N.Y, USA).

D5: mAk gegen E2 von BVDV, erhalten von Dr. E. Weiland (BFAV, Tübingen).

Cy3-Konjugat: Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konjugierter Ziege anti-Maus IgG (H+L) Antikörper (Fa. Dianova # 115-165-003).

PO-Konjugat: Meerrettichperoxidase konjugierter Ziege anti-Maus IgG (H+L) Antikörper (Fa. Dianova).

Gold-Konjugat: mit kolloidalem Gold (10 nm) konjugierter Ziege anti-Maus IgG (H+L) Antikörper (Fa. Biocell).

2.1.3. Virusstämme

BVDV-1 Stamm C86: erhalten von Dr. J. Patel (Intervet International, UK).

Stamm **NADL:** erhalten von Dr. M. Collett (Collett et al., 1988a).

Stamm **Oregon:** Impfvirus Oregon C24V (Kummerer et al., 1998).

Stamm **200085:** von der Firma Intervet (UK) zur Verfügung gestellt.

Stamm **Osloss:** erhalten von Prof. Dr. B. Liess (Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover).

Stamm **CP7:** erhalten von Dr. E. J. Dubovi (Cornell University, Ithaca, N.Y, USA)(Corapi et al., 1989).

Stamm **New York-1 (NY-1):** erhalten von Dr. E.J. Dubovi.

Stamm **5785cp**: erhalten von Dr. M. König (Institut für Virologie, FB10, Justus-Liebig-Universität Giessen).

Stamm **RIT 4350**: Impfvirus der Firma Pfizer (Karlsruhe).

Stamm **519**: erhalten von Dr. P. Becher (Institut für Virologie, FB10, Justus-Liebig-Universität Giessen).

Stamm **721**: erhalten von Dr. P. Becher.

Stamm **Deer-GB1**: isoliert in UK 1986, von Dr. D.J. Paton (Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, Surrey, UK) zur Verfügung gestellt.

Stamm **11468**: erhalten von Dr. M. König.

Stamm **S10**: isoliert aus kontaminiertem Serum, erhalten von Dr. M. König.

Stamm **Leon-6**: isoliert und erhalten von Dr. P. Arias (Universidad de León, Spanien).

BVDV-2 Stamm **890**: erhalten von Dr. J. F. Ridpath (Virology Cattle Research, National Animal Disease Center, USDA, Ames Iowa, USA).

Stamm **SCP**: erhalten von Dr. P. Becher.

Stamm **Gi-1** Klon nzp B7: erhalten von M. König.

Stamm **Gi-2**: erhalten von Dr. M. König.

Stamm **Gi-4**: erhalten von Dr. P. Becher.

Stamm **Gi-5**: erhalten von Dr. P. Becher.

Stamm **Gi-6**: erhalten von Dr. P. Becher.

Stamm **Soldan**: von Dr. Ernst Peterhans, (Institute of Veterinary Virology, University of Bern, Bern, Switzerland) zur Verfügung gestellt.

BDV Stamm **X818**: erhalten von Dr. A. D. Shannon (Elizabeth Mac Arthur Institut, Camden, Australia).

Stamm **BD-31**: erhalten von Dr. J. F. Ridpath.

Stamm **V60 (Reindeer-1)**: isoliert, erhalten von Dr. A. Kosmidou (Staatliches Veterinäruntersuchungsamt, Krefeld, Deutschland).

Stamm **AZ79**: von Dr. H. Schirrmeier (Institut für Diagnostische Virologie, BFAV, Insel Riems, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Becher et al., 2003).

Stamm **17385**: erhalten von Dr. M. König.

Stamm **Gifhorn**: von Dr. H. Schirrmeier zur Verfügung gestellt (Becher et al., 2003).

CSFV Stamm Alfort 187: von Dr. Ahl (BFAV, Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Stamm **Brescia:** von Dr. Ahl (BFAV, Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Stamm Giraffe-1: von Dr. D.J. Paton zur Verfügung gestellt.

Stamm Hobi: von Dr. H. Schirrmeier zur Verfügung gestellt.

Pestivirusisolate: aus der Routinediagnostik des Instituts für Virologie, FB10, Justus-Liebig-Universität Giessen,

Rekombinantes *Autographa californica nuclear polyhedrosis Virus* (AcNPV), *Baculoviridae* (AcNPV- CP7/E2) von Dr. P. Becher bzw. (AcNPV- 890/E2, AcNPV-Gi-1/E2) von Dr. B. Makoschey (Intervet, Boxmeer, Die Niederlande) zur Verfügung gestellt.

2.1.4. Enzyme

<i>Superscript II RNase H⁻ reverse Transkriptase</i> 200 U/μl	Fa. Invitrogen
<i>Taq-Polymerase</i> 5 U/μl	Fa. Gene Craft
<i>RNaseOUT</i> , 40U/μl	Fa. Gibco
Restriktionendonukleasen	Fa. Promega und Serva
Ribonuclease A	Fa. Serva

2.1.5. Seren

Serum 019: Polyklonales Rinderserum gegen BVDV 1 *New-York 1* von Dr. P. Becher (Institut für Virologie, FB10, JLU Giessen) zur Verfügung gestellt.

Foetales bovines Serum (FBS): (Fa. Biowest, Fa. PAA u.a).

FBS für Fusionen: Fetal Bovine Serum (FBS) Myoclone Super Plus, USA, Fa. Gibco.

2.1.6. Oligonukleotide und Sonden

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) und der Firma Qiagen OPERON (Hilden) bezogen. TaqMan[®] Sonden wurden von der Fa. Applied Biosystems (Darmstadt) bezogen.

2.1.7. Vorgefertigte Medien und Systeme

Antibiotika/Antimykotika 100x flüssig	Fa. Invitrogen
BC Assay: protein quantitation kit	Fa. Uptima
HAT 50x flüssig (20 µM A, 5 mM H, 0.8mM T)	Fa. Invitrogen
HT 50x flüssig (5 mM H, 0.8mM T)	Fa. Invitrogen
ImmunoPure [®] Monoclonal Antibody Isotyping Kit (HRP/ABTS)	Fa. PIERCE
GLUTAMAX I 100x (200mM) flüssig	Fa. Invitrogen
QIAEX [®] II, DNA Gel Extraction Kit	Fa. Qiagen
QIAschredder Zellysat-Homogenisatorsäulchen	Fa. Qiagen
NUT.MIX. F10 (HAM) WITH GLUTAMAX I	Fa. Invitrogen
NUT.MIX. F12 (HAM) WITH GLUTAMAX I	Fa. Invitrogen
OptiPrep [™] (60% Iodixanol)	Fa. AXIS-SHIELD PoC AS
Rneasy [®] RNS Präparations Kit	Fa. Qiagen
sf 900 II SFM Medium	Fa. Invitrogen
Silver Stain Kit for proteins	Fa. Fluka
SYBR [®] Green PCR Master Mix (2x)	Fa. Applied Biosystems
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix (2x)	Fa. Applied Biosystems
Termo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit	Fa. Amersham
TOPO TA Cloning Kit	Fa. Invitrogen

2.1.8. Chemikalien

Agar-Agar	Fa. Difco
Agarose (Elektrophorese)	Fa. Difco-Fa BRL
Amoniumperoxidisulfat (APS)	Fa. Serva
Ampicillin	Fa. Roth
Bacto-Yeast Extrakt	Fa. Difco

Bacto-Tryptone	Fa. Difco
BSA	Fa. Serva
Dimethyl-Pimelinediimidat-Dihydrochlorid (DMP)	Fa. Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma
Desoxynukleosid-Triphosphat	Fa. Boehringer Mannheim
Freundsches Adjuvans	Fa. Sigma
Glycin	Fa. Roth
Guanidinthiocyanat	Fa. Roth
Hepes	Fa. Sigma
HiTrap™ 1ml Protein G HP	Fa. Amersham Biosciences
Methylaminwolframat	Fa. Plano Marburg
β-Mercaptoethanol	Fa. Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Fa. Merck
Nitrocellulosemembran	Fa. Schleicher und Schuell
Nonylphenyl-Polyethylenglycol (NP-40)	Fa. Fluka
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	Fa. Fluka
Octyl-D-Glucopyranoside	Fa. Fluka
o-Phenylendiamin (OPD)	Fa. Sigma
Paraformaldehyd	Fa. Fluka
Acrylamid	Fa. Fluka
Phenylmethyl-Sulfonylfluorid (PMSF)	Fa. Sigma
Protein G Sepharose® 4 Fast Flow	Fa. Amersham Biosciences
Sequa Gel XR	Fa. national diagnostics
TEMED	Fa. Boehringer Mannheim
Triethanolamin	Fa. Fluka
Tri-Lithium Citrat x 3H ₂ O	Fa. Fluka
Trizma Base	Fa. Merck
Tween 20	Fa. Sigma
"Ultra Pure Sequa Gel Complete" (Puffer)	Fa. National diagnostics
Urea (Ultra pure)	USB Corporation

Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Bioscience, BRL, Fluka, Merck, Sigma, Serva und Roth bezogen.

2.1.9. Medien und Puffer

2.1.9.1. Medien und Puffer für Zellkultur und Immunfluoreszenz

Zusätze für Kulturmedium:

Aminosäuren-Stammlösung: 0.712 g L-Alanin, 1.2 g L-Asparginsäure, 2.8 g Glycin, 3.0 g L-Glutaminsäure, 1.0 g L-Prolin in 800 ml Aq. dd gelöst bei 60°C und gelagert bei -70°C.

Vitamin-Lösung: 0.010 g/l Biotin in 1l Aq. dd gelöst.

Hypoxanthin-Lösung: 0.25 g Hypoxanthin, 4 ml 1 M HCl in 130 ml Aq. dd unter Erwärmung gelöst und auf 260 ml Aq. dd aufgefüllt.

NaHCO₃-Lösung: 37 g NaHCO₃ in 300 ml Aq. dd gelöst.

Zellkulturmedium CCM-34: Dulbecco's MEM (Fa. Invitrogen) mit Zusätzen. Dulbecco's MEM Pulvermedium für 10 l, 200 ml Aminosäure-Stammlösung, 100 ml Vitamin-Lösung, 260 ml Hypoxanthin-Lösung, 300 ml NaHCO₃-Lösung (s.o.), auf 10 l mit Aq. dd aufgefüllt, sterilfiltriert (0.1 µm) und bei 4°C gelagert.

Medium für Insekten-Zellen: 1 l sf 900 II SFM, 10 ml 100x Antibiotika-Antimykotikalösung (Fa. Invitrogen) (s.o.).

Hepes-Medium: 450 ml CCM-34 Medium, 5 ml Hepes-Lösung (1 M in defiz. PBS gelöst), 1 ml Penicillin/Streptomycin (500x).

Myelom-Medium : 450 ml CCM-34, 15% (75 ml) FBS, 5 ml Glutamax I 100x (Fa. Gibco-Invitrogen), 1.75 ml Mercaptoethanol-Lösung (100 µl in 100 ml defiz. PBS), 5 ml Hepes-Lösung (1 M), 1 ml Penicillin/Streptomycin (500x).

Hybridom-Medium: 200 ml CCM-34, 100 ml Nut.Mix F-10 (Fa- Gibco. Invitrogen), 100 ml Nut.Mix F-12 (Fa- Gibco. Invitrogen), 75 ml FBS, 5 ml Glutamax I, 1.75 ml Mercaptoethanol-Lösung (s.o.), 5 ml Hepes-Lösung (1 M), 1 ml Penicillin/Streptomycin (500x).

HAT-Medium: 500 ml Hybridom-Medium, 10 ml HAT-Lösung 50x (Fa. Gibco-Invitrogen).

HT-Medium: 500 ml Hybridom-Medium, 10 ml HT-Lösung 50x (Fa. Gibco-Invitrogen).

Fusion-Medium: 200 ml CCM-34, 100 ml Nut.Mix F-10, 100 ml Nut.Mix F-12, 10% FBS Myoclonal (Fa. Gibco-Invitrogen), 10 ml Nutridoma-CS 50x (Fa. Roche), 5 ml Glutamax I, 1.75 ml Mercaptoethanol-Lösung (s.o.), 5 ml Hepes-Lösung (1 M), 1 ml Penicillin/Streptomycin (500x).

Trypsin-Lösung: 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1.23 g/l EDTA- $\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 2.5 g/l Trypsin, 1:300 (Fa. Sigma), 0.16 g/l Phenolrot in Aq. dd gelöst, sterilfiltriert (0.1 μm) und bei 4°C gelagert.

Penicillin/Streptomycin 500x: 50 000 UI/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycinsulfat in Aq. dd gelöst, sterilfiltriert (0.1 μm) und bei -20°C aufbewahrt.

Trypanblau-Lösung: 0.25% (w/v) Trypanblau (Serva 37252), 0.15 M NaCl in Aq. dd gelöst, filtriert (0.2 μm) und bei 4°C gelagert.

PBS defiz.: 0.8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1.15 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 950 ml Aq. dd gelöst, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Ca/Mg-Lösung: 0.1 g/l $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 1.16 g/l $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 50 ml Aq. dd gelöst, sterilisiert und bei 4°C gelagert.

PBS: 950 ml PBS defiz. mit Zusatz von 50 ml Ca/Mg-Lösung.

6% PFA: 30 g/l Paraformaldehyd (PFA) gelöst in 400 ml 60°C warmem PBS defiz., unter Zugabe einiger Tropfen 5 M NaOH; nach Einstellen des pH auf 7.6 und Zugabe der 50 ml Ca/Mg Lösung auf 1 l mit Aq. dd aufgefüllt und bei -20°C gelagert. Zur Herstellung der PFA Gebrauchslösung wurde die 6% Lösung 1:3 mit PBS verdünnt und für max. 7 Tage bei 4°C gelagert.

0.5% Octylglucosid: 0.5 % (w/v) N-Octyl-D-Glucopyranosid in PBS gelöst und bei 4°C gelagert.

ABDB-A Puffer: 1 % (w/v) BSA, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.01% (w/v) NaN_3 in 1x TBS (50 mM Tris, 0.85% (w/v) NaCl, pH 7.6); bei 4°C gelagert.

Gey's Puffer: 7.3 g/l NH_4Cl , 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/l CaCl_2 , 0.1 g/l $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in Aq. dd gelöst und bei 4°C gelagert.

2.1.9.2. Puffer für RT-PCR

RNA-Lysispuffer: 4 M Guanidinisothiocyanat, 0.5% (w/v) Sarcosyl, 25 mM Li-acetat in Aq. dd gelöst und bei -20°C gelagert. Vor Benutzung wurde 0.1 M β -Mercaptoethanol zugegeben.

Aq. dd_{DEPC}: doppelt deionisiertes H_2O mit 0.2% (w/v) Diethylpyrocarbonat für 4 Stunden gerührt und danach 2mal autoklaviert.

Aq. dd_{PCR}: doppelt deionisiertes autoklaviertes H_2O für RT-PCR (Fa. Roth).

2.5x RT Puffer (VIII A): 125 mM Tris-HCl pH 8.3, 187.5 mM KCl, 7.5 mM MgCl_2 , 25 mM Dithiothreitol (DTT), 1.25 mM dATP, 1.25 mM dCTP, 1.25 mM dGTP, 1.25 mM dTTP in Aq. dd_{PCR} gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

5x PCR Puffer (VIII B): 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 100 mM KCl, 6.5 mM MgCl_2 , 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) BSA, 1.25 mM dATP, 1.25 mM dCTP, 1.25 mM dGTP, 1.25 mM dTTP in Aq. dd_{PCR} gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Agarosegellösung: 1.5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (s.u.).

DNS-Auftragspuffer: 0.1 % (w/v) Orange G, 5.0% (w/v) Ficoll 400 in 5x TAE Puffer.

DNS-Größenmarker: 40 μg DNS (1 Kb bzw. 100 bp DNA ladder; Fa. Gibco), 250 μl DNS-Auftragspuffer, 1 ml TE-Puffer (s.u.), bei 4°C gelagert.

TAE Puffer: 40 mM Tris, 5 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA in Aq. dd gelöst und auf pH 7.8 eingestellt.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA in Aq. dd gelöst und auf pH 7.6 eingestellt.

Ethidiumbromid: 10 mg/ml Ethidiumbromid Stammlösung (Fa. Fluka) bei 4°C aufbewahrt

2.1.9.3. Puffer und Medien für DNS Klonierung und Sequenzierung

LB-Medium: 10 g/l Bacto Tryptone, 5 g/l Bacto Yeast, 8 g/l NaCl in Aq. dd gelöst, autoklaviert und bei 4°C gelagert

LB-Agarplatten: LB-Medium, 1.5% (w/v) Agar, 75 µg/ml Ampicillin

X-Gal-Lösung: 40 mg /ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid) in Dimethylformamid (DMF) gelöst und bei -20°C gelagert

Lösung für DNS Minipräparationen:

Lösung P1: 100 mM Tris-base, 10 mM EDTA- Na_2 , 800 ml Aq. dd, auf pH 8 mit HCl eingestellt, auf 1 l mit Aq. dd aufgefüllt, nach Zugabe von 400 µg/ml RNase A bei 4°C gelagert.

Lösung P2: 0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS, in Aq. dd gelöst und bei RT gelagert.

Lösung P3: 3 M K-Acetat in Aq. dd gelöst, auf pH 5.5 mit Essigsäure eingestellt.

SOC-Medium: 2% (w/v) Tryptone, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 20 mM Glucose in Aq. dd gelöst, sterilisiert und bei 4°C gelagert.

Stopplösung für Sequenzreaktionen: 1 ml "Loading dry Fluorescent samples" Puffer (Amersham Biosciences), 150 µl 0.1% Bromphenolblau.

4%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (Sequagel XR Fa. national diagnostics): 25.6 ml Sequagel XR (6%), 6.4 ml Sequagel complete Buffer reagent, 6.4 g

Harnstoff, 1.6 ml 10x TBE Puffer (s.u.), 12 ml Aq. dd, 320 µl 10% Amoniumpersulfat (APS), 16 µl TEMED, filtriert (0.45 µm).

TBE Puffer (10x): 0.5 M Tris, 0.5 M Borsäure, 20 mM EDTA in Aq. dd gelöst und mit HCl auf pH 7.6 eingestellt.

2.1.9.4. Puffer für Protein-Zellextraktion

Extraktionslösung für Zellen: 10% (v/v) Glycerol, 1% (v/v) NP 40 in PBS defiz. gelöst und bei 4°C gelagert.

2.1.9.5. Puffer für Reinigung von Antikörper

Puffer A: 0.5 M Na-Phosphat, in Aq. dd gelöst, pH auf 7 eingestellt, filtriert (0.45 µm) und bei RT gelagert.

Puffer B: 20 mM Na-Phosphat, in Aq. dd gelöst, pH auf 7 eingestellt, filtriert (0.45µm) und bei RT gelagert.

Puffer C: 1 M Tris-HCl in Aq. dd gelöst, pH auf 8 aufgestellt, filtriert (0.45 µm) und bei RT gelagert.

Elutionspuffer: 0.1 M Glycin in Aq. dd gelöst, pH auf 2.5 eingestellt, filtriert (0.45 µm) und bei RT gelagert .

2.1.9.6. Puffer für SDS-PAGE

4xVD-Proteinauftragspuffer: 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% (w/v) SDS, 6 M Harnstoff, 0.004% (w/v) Bromphenolblau, 0.004% (w/v) Phenolrot, 40% (v/v) Glycerin, filtriert, auf 4 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für reduzierende Bedingungen Zugabe von 5% (v/v) 2-ME oder 10 mM DTT.

Schägger & Jagow-System Lösungen:

3x Gelpuffer: 3 M Tris-HCl pH 8.5, 0.3% (w/v) SDS, filtriert (0.45 µm) und bei RT gelagert.

10x Anodenpuffer: 2 M Tris-HCl pH 8.9, bei RT gelagert.

10x Kathodenpuffer: 1 M Tris-HCl pH 8.25, 1 M Tricin 1% (w/v) SDS, bei RT gelagert.

Laemmli-System Lösungen:

2x Trenngelpuffer: 0.75 M Tris-HCl pH 8.8, filtriert (0.45 µm) und bei RT gelagert.

2x Sammelgelpuffer: 0.25 M Tris-HCl pH 6.8, mit filtriert (0.45 µm) und bei RT gelagert.

10x Elektrodenpuffer: 0.25 M Tris-HCl pH 8.3, 1.925 M Glycin, 1% (w/v) SDS, bei RT gelagert.

2.1.9.7. Puffer für PAGE-Färbung**Puffer für Coomassie-Färbung**

Coomassie Färbelösung: 0.25% (w/v) Coomassie-blau, 10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Methanol in Aq. dd gelöst und filtriert.

Entfarbelösung für Coomassie: 10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol in Aq. dd.

Puffer für Silber-Färbung:

"Fixing solution": 40 ml Ethanol, 10 ml Essigsäure auf 100 ml mit Aq. dd aufgefüllt.

"Fix/Sensitizing solution": 40 ml Ethanol, 4 ml 1.2% Glutardialdehyd, 2 ml 0.19% Formaldehyd auf 100 ml mit Aq. dd aufgefüllt.

"Sensitizing solution": 4 ml 0.5% Na-Thiosulfat auf 100 ml mit Aq. dd aufgefüllt.

"Silver solution": 4 ml 2.5% Silbernitrat auf 100 ml mit Aq. dd aufgefüllt.

"Developing solution": 2.5 g NaCO_3 , 8 ml 0.19% Formaldehyd auf 100 ml mit Aq. dd aufgefüllt.

"Stop solution": 5 ml Essigsäure auf 100 ml mit Aq. dd aufgefüllt.

"Preserving solution": 5 ml 87% Glycerol auf 100 ml mit Aq. dd aufgefüllt.

2.1.9.8. Puffer für Protein-Transfer auf Nitrozellulosemembran

10x Puffer nach BJERRUM: 480 mM Tris-HCl, 390 mM Glycin in Aq. dd gelöst und bei RT gelagert.

Als 1x Puffer mit 20% Methanol eingesetzt und bei 4°C gelagert.

2.1.9.9. Puffer für die Herstellung von Immunaффinitätssäulen

Puffer A: 20 mM Na-Phosphat in Aq. dd gelöst, pH auf 7 eingestellt, filtriert (0.45µm) und bei RT gelagert.

Puffer B: 0.2 M Na-Tetraborat in Aq. dd gelöst, pH auf 9 eingestellt, filtriert (0.45 µm) und bei RT gelagert.

Puffer C: 20 mM DMP (Dimethyl pimelinediimidate dihydrochloride) in Puffer B aufgelöst und pH zwischen 8 und 9 eingestellt.

Puffer D: 0.2 M Triethanolamin in Aq. dd gelöst, pH auf 8 eingestellt, filtriert (0.45 µm) und bei RT gelagert.

2.1.9.10. Puffer für die Reinigung des E2-Proteins

Puffer 1: 0.5 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl pH 8.2, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA pH 8 in Aq. dd gelöst, filtriert (0.45 µm) und bei 4°C gelagert.

Puffer 2: 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl pH 8.2, 0.5% NP-40, 0.1% SDS, gelöst in Aq. dd, filtriert (0.45 µm) und bei 4°C gelagert.

Puffer 3: 10% Glycerin, 0.5% NP-40 in PBS gelöst, und bei 4°C gelagert.

Elutionpuffer: 0.1 M Glycin in Aq. dd gelöst, pH auf 2.5 eingestellt, filtriert (0.45 µm) und bei RT gelagert.

2.1.9.11. Puffer für Isotypisierung von Ig (mAk)

Waschpuffer: PBS-Tween (s.o.)

"Coating" Puffer: 0.1 M Na-Bicarbonat, pH 9.5 (70 ml 0.1 M NaHCO₃ und 30 ml 0.1 M Na₂CO₃).

"Coating Antibody Working solution": 50 µl "Coating antibody solution" (Ziege anti-Maus Ig (G + A + M) 0.5 mg/ml in PBS) in 5 ml "Coating" Puffer.

"1x Blocking solution": 50 µl 50x "Blocking solution" in 2.5 ml PBS.

"Class/subclass spezifische Kaninchen anti-Maus Ig Antikörperlösungen (in PBS, 1% BSA und 0.05% NaN₃): Kaninchenserum (negative Kontrolle), Kaninchen anti-Maus IgG₁, anti-Maus IgG_{2a}, anti-Maus IgG_{2b}, anti-Maus IgG₃, anti-Maus IgA, anti-Maus IgM, anti-Maus leichte Kette (Kappa), anti-Maus leichte Kette (Lambda).

"Horse raddish peroxidase conjugated goat α rabbit IgG working solution": 50 µl (ein Tropfen) Konjugat in 2.5 ml Waschpuffer.

"ABTS Substrate solution": 50 µl 50x ABTS-Substrate in 2.5 ml 1x ABTS Substrate Puffer (250 µl 10x ABTS Substrat Puffer (1 M Citrat pH 4.2 Puffer, 0.3% H₂O₂ in Aq. dd).

2.1.9.12 Puffer für Biotinylierung von mAK

Biotin-Lösung: 12.5 mg/ml Biotin (D-Biotin-N-Hydroxysuccinimidester, Fa. Roche) in DMF (Dimethylformamid) gelöst und bei -20°C gelagert

Puffer für Biotinylierung: 0.1 M Na-Borat pH 8.8 filtriert und bei RT gelagert

2.1.9.13. ELISA- Puffer

10x ELISA-Waschpuffer: 0.3 M NaCl, 20 mM Tris, 2.5 mM KCl, gelöst in Aq. dd, auf pH 7.4 eingestellt, und 0.05% Tween 20 (v/v) dazu gegeben.

Block-Puffer: 5% BSA, 0.02% NaN₃ in PBS gelöst, frisch angesetzt.

Citrat-Puffer: 0.1 M Citronensäure, 0.1M tri-Natriumcitrat-dihydrat auf pH 5 eingestellt.

OPD Substrat: 2 mg/ml OPD (o-Phenylendiamine) in Citrat-Puffer gelöst, bei -20°C eingefroren und von Licht geschützt aufbewahren. Vor Benutzung 1,5 µl 30% H₂O₂ dazu pipettieren.

ELISA Stopp-Lösung: 3 M H₂SO₄ in Aq. dd verdünnt.

2.1.10. Geräte

Analysenwaage	Fa. Sartorius
Bakterienschüttler	Fa. Heraeus
Brutschränke (CO ₂ -Begasung)	Fa. Forma Scientific
CCD-Mikroskopkamera (F-View II) und Software für Dokumentation	Fa. Soft-Imaging Systems
DNA Sequencer Modell 4000L LI-COR	Fa. MWG Biotech
Elektronenmikroskop (EM 902)	Fa. ZEISS
Elektrophorese Power Supply	Fa. Amhersam
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert und Filtermodule	Fa. ZEISS
Geldokumentationssystem (DNS Elektrophorese)	Fa. MWG Biotech
Gelkammern (DNA)	Werkstatt des Instituts für Virologie
Invertmikroskop	Fa. ZIESS
Kryo-Einfriergeräte (Mr. Frosty)	Fa. NALGENE™
Magnetrührer	Fa. IKAMAG® REO
Mehrkanalpipetten	Fa. Micronic® System
Mehrkanaldispensierpipetten	Fa. Biohit
Mikroliterpipetten (10µl, 20µl, 200µl und 1 ml)	Fa. Gilson
Mikrowellenherd	Fa. Sanyo

pH-Meter	Fa. Knick
Photometer (GeneQuant II)	Fa. Pharmacia Biotech
Pipettierhilfe (Pipet Boy Plus)	Fa. Integra Bioscience
Schlauchpumpe (ECONO PUMP)	Fa. BIO RAD
Sicherheitswerkbank Klasse II (LaminAir Sterilbank)	Fa. Clean Air
Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400)	Fa. Perkin Elmer
Real time PCR-Gerät ABI 7000 SDS	Applied Biosystems
Tiefkühlschränke (-20°C, -70°C)	Fa. Liebherr
UV-Leuchtplatte (254nm)	Fa. Bachofer
Ultrafiltrationssystem "Ultrafiltration cell, model 52"	Amicon Corporation
Vortex	Fa. IKA
Wasserbad	Fa. Memmert
Waage (0.5 g-1500 g)	Fa. Mettler Toledo
Zentrifugen (Megafuge und Mikrozentrifuge)	Fa. Heraeus
Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal	Fa. Fisher Scientific

2.1.11. Genbank-Zugangsnummern

Genbank Zugangs-Nummern					
Stamm	Komplettes Genom	partielle		E2-Sequenz	Autoren
		Polyprotein Sequenz	N ^{pro} -Sequenz		
NADL	M31182	-	-	-	(Colett et al. 1988a)
Oregon	AF0141040	-	-	-	(Kummerer et al., 1998)
SD-1	N96751	-	-	-	(Deng und Brock 1992)
CP7	V63479	-	-	-	(Meyers et al., 1996)
Osloss	M96687	-	-	-	(De Moerloose et al., 1993)
890	U18059	-	-	-	(Ridpath und Bolin 1995)
C-413	AF002227	-	-	-	(Chen et al., 1997, n.v.)
NY-93	AF502399	-	-	-	(Meyer et al. 2002)
Alfort-T	J04358	-	-	-	(Meyers et al., 1989)
Glenfort	U45478	-	-	-	(Muller et al., 1996)
C-strain	Z46258	-	-	-	(Moormann et al. 1996)
X818	AF037405	-	-	-	(Becher et al., 1988)
BD-31	U70263	-	-	-	(Ridpath und Bolin 1997)
Giraffe-1	AF144617	-	-	-	(Avalos-Ramirez et al., 2001)
Reindeer-1	AF144618	-	-	-	(Avalos-Ramirez et al., 2001)
1373	-	AF145967	-	-	(Ridphat und Waltz, n.v.)
28508-5	-	AF145968	-	-	(Flores et al., 2002)
296nc	-	AF145969	-	-	(Ridphat und Waltz, n.v.)
AzSpln	-	AF145970	-	-	(Ridphat und Waltz, n.v.)
Parker	-	AF145971	-	-	(Ridphat und Waltz, n.v.)
Pronghorn	-	AF410791	-	-	(Vilcek et al., n. v.)
CD-87	-	U44901	-	-	(Tijssen et al., 1996)
1494	-	U44905	-	-	(Tijssen et al., 1996)
SF4	-	U44906	-	-	(Tijssen et al., 1996)
137-4	-	L05402	-	-	(Roehe et al., 1992)
L83-84	-	U00890	-	-	(Becher et al., 1994;
		U17145	-	-	Becher et al., 1995)
IDA	-	AJ238812	-	-	(Loehr et al., 1999, n. v.)
2313-Uk	-	-	AF287279	-	(Vilcek et al., 2001)
26-Fr	-	-	AF287281	-	(Vilcek et al., 2001)
3-It	-	-	AF287282	-	(Vilcek et al., 2001)

Stamm	Genbank Zugangs-Nummern				Autoren
	Komplettes	partielle	N ^{pro} -Sequenz	E2-Sequenz	
	Genom	Polyprotein Sequenz			
A-AU	-	-	AF287283	-	(Vilcek et al., 2001)
G-AU	-	-	AF287285	-	(Vilcek et al., 2001)
J-AU	-	-	AF 287286	-	(Vilcek et al., 2001)
L-AU	-	-	AF287287	-	(Vilcek et al., 2001)
Singer	-	-	AF145364	-	(Huntley et al., n.v.)
Goat-G1	-	-	U80898	-	(Becher et al., 1997)
Buffalo-A1	-	-	U80901	-	(Becher et al., 1997)
871	-	-	AF144462	-	(Becher et al., 1999b)
RIT	-	-	AF144465	-	(Becher et al., 1999b)
Gi-4	-	-	AF144468	-	(Becher et al., 1999b)
Gi-5	-	-	AF144469	-	(Becher et al., 1999b)
519	-	-	AF144464	AF144610	(Becher et al., 1999b)
C86	-	-	AF144466	AF144611	(Becher et al., 1999b)
Gi-1	-	-	AF104030	AF104030	(Becher et al., 1999b)
Gi-6	-	-	AF144470	AF144612	(Becher et al., 1999b)
Deer-NZ1			U80903	AF144614	(Becher et al., 1999b)
Deer-GB1	-	-	U80902	AF144615	(Becher et al., 1999b)
PG2	-	-	AY163647	AY163654	(Becher et al., 2003)
V2535	-	-	AY163648	AY163655	(Becher et al., 2003)
466	-	-	AY163650	AY163657	(Becher et al., 2003)
17385	-	-	AY163651	AY163658	(Becher et al., 2003)
AZ79	-	-	AY163652	AY163659	(Becher et al., 2003)
Gifhorn	-	-	AY163653	AY163660	(Becher et al., 2003)
NY-1	-	-	AF145363	AY027671	(Avalos-Ramirez et al., 2001)
SCP	-	U17149	-	AF144613	(Becher et al., 1995; Becher et al., 1999b)
T1802	-	-	-	AY163655	(Becher et al., 2003)
125e	-	-	-	AF083345	(Deregt et al., 1998)
SilLke	-	-	-	AF083346	(Deregt et al., 1998)
Hastings	-	-	-	AF083349	(Deregt et al., 1998)
Gi-2				AY027674	(Becher et al., 1999b)

n.v. = nicht veröffentlicht

2.2. METHODEN

2.2.1 Zellkulturtechniken

2.2.1.1 Adhärenente Säuger-Zelllinien

Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank, Klasse II) durchgeführt. Bei MDBK, SFT-R, und PK-15 handelt es sich um adhärenente Säuger-Zelllinien, die jeweils für 3-4 Tage gehalten und anschließend passagiert wurden. Hierzu wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit Trypsinlösung bei 37°C für ca. 5 Min. inkubiert, vereinzelt und in geeigneten Verdünnungen (MDBK 1:35, SFT-R 1:30 und PK-15 1:15) in neue Kulturschalen (Durchmesser 10 cm, Fa. Falcon) mit Kulturmedium (inkl. 10% FBS) ausgesät. Die Kulturen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Inkubator (Steri-Cult 2000, Fa. Forma Scientific) gehalten.

2.2.1.2 Hybridom- und Myelomzellen

Für die Kultivierung der Myelomzelllinien SP 2/0 und den daraus gewonnenen Hybridomzellen wurde ein spezielles Kulturmedium (Myelom- oder Hybridom-Medium incl. 15% FBS benutzt. Bei einer Zelldichte von ca. 1×10^6 Zellen/ml Kulturmedium wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die Zellen resuspendiert und im Verhältnis 1:50 bis 1:100 passagiert.

2.1.1.3 Insektenzellen (SF-21)

Bei SF-21 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus dem Ovar von *Spodoptera frugipeda*, die bei 27°C ohne CO₂-Begasung ein gutes Wachstum zeigt. Die Vermehrung von SF-21 erfolgte in Zellkulturflaschen (Fa. Falcon) mit einer Fläche von 25 cm² (T25), 75cm² (T75) oder 175 cm² (T175). Hierzu wurde alle 4 Tage der Überstand abgenommen, die Zellen mit 1 ml (T25), 3 ml (T75) oder 5ml (T175) sf 900 II SFM Medium (Fa. Invitrogen) resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:5 passagiert.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Adhärenent wachsende Zelllinien wurden mit Trypsinlösung abgelöst und in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden 1:10 mit Trypanblau-Färbelösung versetzt und in einer

Zählkammer nach *Fuchs-Rosenthal* unter einem Invertmikroskop ausgezählt. Die Auszählung berücksichtigte 4 große Quadrate der Kammer (Diagonale). Gezählt wurden nur lebende Zellen ohne sichtbare Blaufärbung. Die folgende Formel ermittelt die Zellzahl (Zellen/ml).

$$\text{Zellzahl/ml} = n \times 4 \times V \times 1000/3.2 \quad n = \text{Zellen in 4 Großquadraten}$$

V= Verdünnungsfaktor

2.2.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Die abgelösten Zellen wurden in Einfriermedium (10% (v/v) DMSO in FBS) in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in Einfrier Röhrchen aufgenommen. Vor Lagerung der Zellen über flüssigem Stickstoff (N_2) wurden die Zellen in einem Einfriergerät (Mr. Frosty, Fa. NALGENETM) langsam ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) auf -70°C heruntergekühlt.

Die eingefrorenen Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in Kulturmedium aufgenommen, gewaschen und schließlich in Kulturmedium auf Kulturgefäße ausgesät.

2.2.2 Isolierung von Pestiviren aus Probenmaterial

Pestiviren aus Untersuchungsmaterial lassen sich vergleichsweise einfach über Anzucht in der Zellkultur (MDBK, SFT-R u.a.) isolieren. Hierzu wurden die empfänglichen Zellen in 24well Platten so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Infektion einen etwa 80% konfluenten Zellrasen bildeten (5×10^5 Zellen/ml). Für jede Probe wurden Testkulturen als Triplikate angelegt und mit dem Untersuchungsmaterial (z.B. aus gerinnungsgehemmten Blutproben (1-5 ml EDTA- oder Li-Heparinat-Blut) präparierte Leukozyten in Suspension, ausgeschüttelte Tupferproben oder Organsuspensionen (lymphatische Organe, Speicheldrüsen, Darm, ZNS)) inokuliert. Die Kulturen wurden drei bis vier Tage nach der Inokulation mikroskopisch beurteilt (zytopathischer Effekt). Der Überstand wurde abgenommen und für weitere Analysen auf -70°C eingefroren. Der Zellrasen wurde für den Nachweis von Pestivirusantigenen mittels indirekter Immunfluoreszenz eingesetzt.

2.2.3 Vermehrung von Pestivirusisolaten

Pestivirusisolate wurden auf MDBK, SFT-R bzw. PK-15 Zellen vermehrt. Hierzu wurden 10 cm Kulturschalen mit einem zu 80 % konfluenten Zellrasen mit Virus in Medium ohne FBS infiziert (m.o.i. 1-10). Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert und die Kulturschalen danach mit 10 ml Kulturmedium (10% (v/v) FBS) aufgefüllt. Nach 3 Tagen Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und bei -70°C eingefroren. Der Zellrasen wurde u.a. für die RNS-Präparation (s.u.) eingesetzt.

2.2.4 Titration von Pestiviren

Virustitrationen wurden direkt in 96well Platten durchgeführt. Hierzu wurden 100 µl Kulturmedium ohne FBS pro Vertiefung vorgelegt. 25 µl des Virusstocks wurde in vier Replikaten in der ersten Reihe eingesetzt und in Fünferschritten (25 µl) weiterverdünnt. Daraufhin wurden 100 µl Zellsuspension (2.5×10^5 MDBK-Zellen /ml in Kulturmedium mit 10% FBS) pro Vertiefung zugegeben und der Ansatz 72 Stunden bei 5% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung der Titration erfolgte bei zp Pestiviren über die Identifikation des virusspezifischen zpE und bei nzp Pestiviren über indirekte Immunfluoreszenz (s.u.).

Titer wurden gemäß der Formel von Spaermann und Kärber berechnet und als TCID₅₀ angegeben (Kärber, 1931).

2.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Zum spezifischen Nachweis einer Pestivirusinfektion von Zellkulturen wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit pestivirus-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Hierzu wurden Zellrasen nach dem Abnehmen des Überstandes mit PBS gewaschen und die Testkulturen mit 200 µl Fixans (2% PFA) pro Vertiefung für 20 Min. bei 4°C fixiert. Das Fixans wurde abgegossen und die Platte mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 200 µl 0.05% Octylglucosid pro Vertiefung für 5 Min. bei Raumtemperatur (RT) permeabilisiert und danach mit PBS gewaschen. In jede Vertiefung wurde 200 µl (24well Platten) bzw. 50µl (96well Platten) Gebrauchsverdünnung des Primärantikörpers (mAk Code 4 1:8 im ABDB-A Puffer) pipettiert. Die Platten wurden für eine Stunde bei 37°C in

feuchter Atmosphäre inkubiert und danach mit PBS gewaschen. 200 µl der frisch angesetzten Gebrauchsverdünnung des Detektionsantikörpers (Ziege anti-Maus-Cy3 1:500 im ABDB-A Puffer) wurden zugegeben und für 60 Min. bei 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert. Nach dem Waschen der Platten mit PBS erfolgte die Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop bei Grünanregung (ca. 552 nm). Die Testkulturen wurden auf eine zytoplasmatische Fluoreszenz untersucht. Die Vertiefungen wurden als positiv gekennzeichnet, wenn mindestens ein fluoreszierender Plaque bzw. eine fluoreszierende Zelle beobachtet wurden.

2.2.6 Reverse Transkription–Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

2.2.6.1 RNS Präparation

Zur Präparation von RNS wurden Zelllinien in Gewebekulturschalen (10 cm Durchmesser) infiziert und für 2 – 3 Tage inkubiert. Im Anschluß wurde das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Zellen mit 2 ml RNS-Lysispuffer lysiert. 350 µl des Lysates wurden unmittelbar für die RNS Präparation eingesetzt und der Rest bei –20°C aufbewahrt.

Für die RNS Präparation wurde das Rneasy® RNS Präparations Kit und QIAshredder Zelllysat-Homogenisatorsäulchen (Fa. Qiagen) verwendet. Das Zelllysat wurde auf Homogenisatorsäulchen gegeben und bei 13,000 rpm für 3 Min. zentrifugiert. Dem Durchlauf wurde 1 Vol (350 µl) 70% Ethanol (p.A.) zugegeben und mit einer Pipette gemischt. 700 µl des Ansatzes wurden auf eine RNS Präparationssäule (Rneasy Kit) überführt und bei 10,000 rpm 15 Sek. zentrifugiert. Die Säule wurde nacheinander mit 700 µl Waschpuffer RW1 (Rneasy Kit) und zweimal mit 500 µl Waschpuffer RPE (Rneasy Kit) beschickt und jeweils zentrifugiert (s.o.); der letzte Zentrifugationsschritt erfolgte bei 13,000 rpm für 2 Min. Darauf wurde die Säule in ein frisches 1.5 Röhrchen überführt und die gebundene RNS mit 30 µl Aq dd_{DEPEC} oder AVE-Puffer eluiert (Zentrifugation bei 10,000 rpm für 1 Min.). Die RNS wurde auf 4°C überführt bzw. zur weiteren Lagerung bei –20°C eingefroren.

2.2.6.2 Diskriminierende BVDV-2 RT-PCR

Ausgehend von der präparierten RNS wurde zunächst mittels eines pan-Pestivirus spezifischen Primers (OI 380R) cDNS synthetisiert. In der folgenden PCR wurden zusätzlich ein pan-Pestivirus Primer (OI 100) (Becher, Orlich, and Thiel, 1998) und BVDV-2 spezifische Primer (S200a, S200b und S200c) eingesetzt, die alle bekannten BVDV-2 Sequenzen abdecken. Die beschriebene diskriminierende RT-PCR erlaubt die Unterscheidung zwischen BVDV-2 und anderen Vertretern des Genus Pestivirus.

2.2.6.2.1 Auswahl der Primer

Die RT-PCR zur Diskriminierung von BVDV-2 wurde für die 5' nicht translatierte Region (5'NTR) des Pestivirusgenoms etabliert. Die Auswahl der spezifischen Primer erfolgte nach Sequenzvergleichen von mehr als 200 pestiviralen Sequenzen (Daten nicht gezeigt). Die als Lyophilisate bezogenen Primer wurden mit Aq dd_{PCR} rekonstituiert, eine Endkonzentration von 1 µg/µl eingestellt und in 20 µl Aliquots bei –20°C gelagert.

Reverse Primer

pan-Pestivirus Primer

OI 380R 5'-AAC TCC ATG TGC CAT GTA GAG – 3' (Becher et al., 1998)

Kodierende Primer

pan-Pestivirus Primer

OI 100 5'-CAT GCC CWY AGT AGG ACT AGC– 3' (Becher et al., 1998)

BVDV-2 Primer

S200a 5'-CAC TCC ATT AGT YGA GGA G- 3'

S200b 5'-CGC TCT GGC AAC AAG AGA G- 3'

S200c 5'-CGC TCT GGC AAT RCA AGA G- 3'

2.2.6.2.2. Reverse Transkription (RT)

Alle Reagentienmische für die RT-PCR wurden als Mastermische angesetzt. Die Herstellung der Mastermische erfolgte räumlich getrennt von der Durchführung der RT-PCR und der Analyse der Amplifikationsprodukte.

Start-Mix (Tabelle 1) wurde angesetzt und jeweils 9 µl in 0.2 ml PCR-Röhrchen pipettiert. 2.5 µl der präparierten RNS sowie positive und negative RNS-Kontrollen bzw. Aq. dd_{PCR} für die Kontaminationskontrollen wurden zugegeben. Die Ansätze wurden bei 94°C für 3 Min. in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt) denaturiert und danach auf 4°C abgekühlt. 8.5 µl RT-Mix (Tabelle 1) wurden jedem Ansatz zugegeben, bei 37°C für 30 Min. inkubiert, dann für 2 Min. auf 80 °C erhitzt (Inaktivierung der reversen Transkriptase), abgekühlt auf 20°C und nach 2 Min. auf 4°C abgekühlt.

2.2.6.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nach der RT wurden jedem Ansatz 30 µl PCR-Mix (Tabelle 1) zugegeben und über 30 Zyklen (bei 94°C für 30 Sek. (Denaturierung); bei 55°C für 30 Sek. (Annealing); bei 72°C für 30 Sek. (Elongation)) inkubiert. Abschließend wurden die Ansätze für 5 Min. auf 72°C gebracht und schließlich auf 4°C abgekühlt.

2.2.6.2.4. Analyse der Amplifikationsprodukte

1.5% Agarose wurde in 1x TAE Puffer aufgekocht und ein horizontales Agarosegel gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer (inklusive 1µl/100ml Ethidiumbromidlösung) überschichtet. Jeweils 2 µl Auftragspuffer wurden mit 8 µl der Reaktionsprodukte gemischt und in eine Vertiefung des Agarosegels überführt. Zusätzlich wurde 10 µl eines DNS-Markers in eine Vertiefung pipettiert. Die Reaktionsprodukte wurden für ca. 35 Min. bei 100 V (ca. 7V/cm) aufgetrennt und danach unter UV-Licht (245 nm) betrachtet. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde photographisch dokumentiert.

Mix	Menge pro Ansatz	Reagenz	Amplifikationsbedingungen
Startmix	0.2 µl 8.8 µl 9 µl	OI 380R (1 µg/µl) Aq. dd _{PCR}	RNS-Denaturierung 94°C-3.Min. Abkühlung 4°C-30 Sek.
RT-Mix	8 µl 0.25 µl 0.25 µl 8.5 µl	Puffer VIIIA * RNase Inhibitor* Reverse Transkriptase*	RT (cDNS Synthese) 37°C-30 Min. Enzymdenaturierung 80°C-2 Min. Abkühlung 20°C-2 Min. Abkühlung 4°C-30 Sek.
PCR-Mix	19 µl 10 µl 0.2 µl 0.2 µl 0.2 µl 0.2 µl 0.2 µl 30 µl	Aq. dd _{PCR} Puffer VIIIB* OI 100 (0.1 µg/µl) S200a (1 µg/µl) S200b (1 µg/µl) S200c (1 µg/µl) Polymerase*	PCR (30 Zyklen) Denaturierung 94°C-30 Sek. Annealing 55°C-30 Sek. Elongation 72°C-30 Sek. Abschließende Elongation 72°C-5 Min. Abkühlung 4°C

Tabelle 1. RT-PCR Mixe und Amplifikationsbedingungen für BVDV-2 diskriminierende RT-PCR.

*Puffer und Enzym-Beschreibung (s.o.)

2.2.6.3. BVDV-1 spezifische RT-PCR

Zur direkten Identifikation von BVDV-1 Infektionen bei Rindern und anderen Wiederkäuern wurde zusätzlich eine BVDV-1 spezifische RT-PCR für den 5'-terminalen Bereich des N^{pro} Gens etabliert.

2.2.6.3.1. Auswahl der Primer

Die Auswahl der BVDV-1 spezifischen Primer erfolgte unter Berücksichtigung von mehr als 150 pestiviralen Sequenzen. Alle Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) als Lyophilisate bezogen, mit Aq. dd_{PCR} rekonstituiert und in einer Endkonzentration von 1 µg/µl in 20 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

*Reverse Primer***BVDV-1 Primer**BVD1r a **5' -GCC CYT TGC TGT TAC CCG T- 3'**BVD1r b **5' -GTC CTY TGC TAT TGC CTA A- 3'***Kodierende Primer***pan-Pestivirus Primer****OI 380** 5'-CTC TAC ATG GCA CAT GGA GTT- 3' (Becher et al., 1998)**2.2.6.3.2. RT-PCR und Analyse der Amplifikationsprodukte**

Durch die Kombination von zwei BVDV-1 spezifischen Primern (BVD1r a und b) mit einem pan-Pestivirus Primer (OI 380) wurde für BVDV-1 Isolate ein Amplifikationsprodukt von 244 Bp generiert. RT-PCR und Analyse der Amplifikationsprodukte wurden wie oben angegeben durchgeführt. RT-PCR Mixe und Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 2 beschrieben.

Mix	Menge pro Ansatz	Reagenz	Amplifikationsbedingungen
Startmix	0.2 µl 0.2 µl 8.6 µl 9 µl	BDV1r a (1µg/µl) BDV1r b (1µg/µl) Aq. dd _{PCR}	RNS-Denaturierung 94°C-3.Min. Abkühlung 4°C-30 Sek.
RT-Mix	8 µl 0.25 µl 0.25 µl 8.5 µl	Puffer VIIIA * RNAse Inhibitor* Reverse Transkriptase*	RT (cDNS Synthese) 37°C-30 Min. Enzymdenaturierung 80°C-2 Min. Abkühlung 20°C-2 Min. Abkühlung 4°C-30 Sek.
PCR-Mix	19.6 µl 10 µl 0.2 µl 0.2 µl 30 µl	Aq. dd _{PCR} Puffer VIIIB* OI 380 (1µg/µl) Polymerase*	PCR (30 Zyklen) Denaturierung 94°C-30 Sek. Annealing 55°C-30 Sek. Elongation 72°C-30 Sek. Abschließende Elongation 72°C-5 Min. Abkühlung 4°C

Tabelle 2. RT-PCR Mixe und Amplifikationsbedingungen für die BVDV-1 spezifische RT-PCR.

* Beschreibung der Puffer und Enzyme (s.o.)

2.2.7. Real time RT-PCR

2.2.7.1. Auswahl der Primer und TaqMan® Sonden

Primer, die sich für den Einsatz in der real time PCR unter Verwendung von TaqMan® Sonden eignen, müssen besondere Voraussetzungen erfüllen: Die Schmelztemperatur (T_m) soll bei 60°C liegen, es dürfen keine Abfolgen identischer Basen vorliegen (>4 Basen, insbesondere G) und der GC-Anteil soll ca. 50% betragen. Die Amplifikationsprodukte müssen zwischen 50 und 150 Bp lang sein.

Geeignete Primer, die ein 147 Bp langes Fragment flankieren, wurden im 5' NTR Bereich unter Berücksichtigung von mehr als 100 Pestivirussequenzen so ausgewählt, dass die Amplifikation aller Pestivirussequenzen möglich sein sollte.

Reverser Primer

PV-03R 5' - TCC ATG TGC CAT GTA CAG CAG - 3'

Kodierender Primer

PV-02 5' - GTG GAC GAG GGC ATG CC - 3'

TaqMan® Sonden sollen so gewählt werden, dass sie einen 40-60%-igen GC-Anteil, keine Abfolgen identischer Nukleotide, keine repetitiven Sequenzmotive und keinen G-Rest am 3' Ende haben. Die Länge der Sonden sollte zwischen 20 und 40 Basen betragen. Die Bindungsstelle der Sonden darf nicht mit denen der Primern überlappen und die T_m muss etwa 10°C höher als bei den Primern liegen. Diese Sonden sind am 5' und 3' Ende mit Fluorochromen (Reporter und Quencher) markiert. Die Auswahl der beiden Sonden PV-Taq01 (Spezifität BVDV-1) und PV-Taq02 (Spezifität BVDV-2) erfolgte unter Berücksichtigung von ca. 100 Pestivirussequenzen im 5' NTR Bereich. Die Sonden wurden mit unterschiedlichen Reporter-Fluorochromen (FAM bzw. VIC) markiert.

Sonde Taq-01

5' FAM - ACA GTC TGA TAG GAT GCT GCA GAG GCC C – TAMRA 3'

Sonde Taq-02

5' VIC – CAG GTC TCT GCT ACA CCC TAT CAG GCT GTG – TAMRA 3'

2.2.7.2. Real time RT-PCR (SYBR[®]Green)

Um die Vorhersagen bezüglich der Spezifität der Primer zu testen, wurde zunächst eine real time RT-PCR unter Verwendung von SYBR[®]Green etabliert.

2.2.7.2.1. Reverse Transkription (RT)

Jeweils 14 µl Mastermix A (Tabelle 3a) und 5 µl präparierte RNS wurden in 0.2ml Röhrchen pipettiert. Der Ansatz wurde bei 94°C für 3 Min. in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400) denaturiert und danach auf 4°C abgekühlt. 81µl Mastermix B (Tabelle 3a) wurden jedem Ansatz zugegeben. Die Ansätze wurden bei 45°C für 30 Min. inkubiert, dann auf 94°C 2 Min. erhitzt (Inaktivierung der reversen Transkriptase) und schließlich auf 4°C abgekühlt.

2.2.7.2.2. Real time PCR (SYBR[®]Green)

Die Spezifität der Primer PV-03R und PV-02 wurde mit 24 Pestivirusstämmen aus verschiedenen Virusspezies getestet. Hierzu wurden jeweils 54 µl Real time PCR Mix (SYBR[®]Green)(Tabelle 3b) in 0.2ml Röhrchen pipettiert und 6 µl cDNS dazugegeben. Die PCR wurde in einem PE-Thermocycler (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Fa. Applied Biosystems) unter Verwendung des Universal-Protokolls (Tabelle 3) durchgeführt. Jede Probe wurde als Duplikat oder Triplikat eingesetzt. Die Schmelzpunkt-Analysen der Amplifikate, und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der ABI Prism 7000 SDS Software.

2.2.7.3. TaqMan®PCR und Multiplex TaqMan®PCR

Für die TaqMan®RT-PCR für Pestiviren wurden zunächst die TaqMan-Sonden PV-Taq01 und PV-Taq02 separat getestet und anschließend zusammen in einer Multiplex-TaqMan PCR (Tabelle 3) eingesetzt. Das Reaktionsspektrum der Sonden wurde unter Verwendung von Isolaten aus allen bekannten Pestivirusspezies untersucht.

Die Reverse Transkription wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Jeweils 54 µl TaqMan®PCR Mix (Tabelle 3) wurden in 0.2 ml Röhrchen pipettiert und 6 µl der cDNS dazugegeben. Die Ansätze wurden in einem ABI PRISM 7000 Sequence Detection System unter Verwendung eines Universal-Protokolls (Tabelle 3) inkubiert. Jede Probe wurde als Duplikat oder Triplikat angesetzt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der ABI Prism 7000 SDS Software.

2.2.8. DNS-Sequenzierung und phylogenetische Analyse

2.2.8.1. RT-PCR für N^{pro}-Gen Sequenz

Zur weiteren molekularen Charakterisierung ausgewählter Pestivirusisolate wurden die für das N^{pro} Gen kodierenden Nukleinsäuresequenzen bestimmt. Hierzu wurden die Primer 1400R und 01 100 (Becher et al., 1997; Becher et al., 1998) für die RT-PCR verwendet, um ein Amplifikationsprodukt von ca. 1.3 kB zu generieren, das die N^{pro}-Gen Sequenz enthält. Die Primer sind in Tabelle 4 beschrieben. Folgende Pestivirus-Stämme wurden in dieser Arbeit sequenziert: 12524/98, 12482/99, 11468/99, 10558/99, 3709/99, 22878/00, 22755/00 (Antilope-G1), 22531/00, AZ79/00, 18605/00, 18602/00, 17385 /00, S14-2/00, S14-1/00, S10/00, K7-00, 2230/00, 659/00, 653/00, VD Paplitz/01, 287-7KH/01, 387KH/01, 5785/01, Soldan/01, 5273/02, , 14652/02, 14657/02, 14658/02, 14816/02, 19371/02, 22424/02, 4478/02, C79, 221, 200085, 700097, Hobi und ED.

Die RT-PCR Mixe und die Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

2.2.8.2. RT-PCR für E2-Gen Sequenz

Zur weiteren molekularen Charakterisierung von ausgewählten Pestiviren wurden zusätzlich die für das E2-Glykoprotein kodierenden Nukleinsäuresequenzen ermittelt. Die

verwendeten Primer sind in Tabelle 4 beschrieben. Die RT-PCR Mixe und die Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Stamm/ Sequenz	Primer	Primer-Sequenz	Autoren
Alle-N ^{pro}	OI 100	5'-CAT GCC CWY AGT AGG ACT AGC-3'	(Becher et al., 1998)
	OI 1400R	5'-ACC AGT TGC ACC AAC CAT G-3'	(Becher et al. 1997)
S10-E2	OI 35A	5'-AAR TAR TCT GTC ACA TAA CT-3'	(Becher et al., 1994)
	OI P2250	5'-AYT GGT GGC CNT ATG ARA C-3'	(Avalos-Ramirez et al., 2001)
11468-E2	OI Deer E2R	5'-AGG YCH TYT GTT CTG ATA-3'	(Becher et al., 1999)
	OI P2250	5'-AYT GGT GGC CNT ATG ARA C-3'	(Avalos-Ramirez et al., 2001)
AZ79-E2	OI RP7R1	5'-CCA YTT CTT TAY KGG CTC ATC-3'	(Becher et al., 1999)
	OI P2250	5'-AYT GGT GGC CNT ATG ARA C-3'	(Avalos-Ramirez et al., 2001)
17385-E2	OI 2P7R	5'-GTT GCC TAT CAT GAC TAT CTC-3'	(Becher et al., 1999)
	OI R1400	5'-GAG AAG ACC AAC TAC ACA TG-3'	(Becher et al., 1999)
	OI P2250	5'-AYT GGT GGC CNT ATG ARA C-3'	(Avalos-Ramirez et al., 2001)

Tabelle 4: Primer für das N^{pro}- und E2-Gen. W= A oder T; Y= C oder T; R= A oder G; N= A, G, C, oder T; H= A, C oder T; K= G oder T.

Mix	Menge pro Ansatz	Reagenz	Amplifikationsbedingungen
Startmix	1 µl	Rev. Primer (0.1 µg/µl)	RNS-Denaturierung 94°C-3. Min.
	8 µl	Aq dd _{PCR}	Ab Abkühlung 4°C-30 Sek.
	9 µl		
RT-Mix	8 µl	Puffer VIIIA *	RT (cDNS Synthese) 37°C-30 Min.
	0.25 µl	RNAse Inhibitor*	Enzymdenaturierung 80°C-2 Min.
	0.25 µl	reverse Transkriptase*	Abkühlung 20°C-2 Min.
	8.5 µl		Abkühlung 4°C-30 Sek.
PCR-Mix	18.8 µl	Aq dd _{PCR}	PCR (25 Zyklen)
	10 µl	Puffer VIIIB*	Denaturierung 94°C-30 Sek.
	1 µl	Cod. Primer (0.1 µg/µl)	Annealing 50°C-30 Sek.
	0.2 µl	Polymerase*	Elongation 72°C-1 Min.
	30 µl		Abschließende Elongation 72°C-10 Min.
			Abkühlung 4°C

Tabelle 5. RT-PCR Mixe und Amplifikationsbedingungen für Amplifikation des N^{pro}-Gens bzw. des E2-Gens. * Beschreibung der Puffer und Enzyme s.o.

2.2.8.3. Isolierung der DNS Fragmente aus Agarosegelen

Zur Auftrennung der amplifizierten DNS wurden 1.5% (w/v) Agarosegele verwendet. Die gewünschten DNS Fragmente wurden unter UV Licht (302 nm) lokalisiert, ausgeschnitten und die Gelstückchen in 1.5 ml Röhrchen überführt. Die Reinigung der DNS aus der Agarose erfolgte mit Hilfe des "QIAEX[®] II, DNA Gel Extraction Kit" (Fa. Qiagen) nach der Vorschrift des Herstellers. Hierbei wird die DNS von Salzen, Enzymen u.a. getrennt. Zu den ausgeschnittenen Agarosestückchen wurden 3 Volumina QX1-Puffer (für je 100 µg Agarosegel 300 µl Puffer) und 20 µl Silikamatrix-Lösung (QIAEX II) gegeben und bei 56°C 10 Min. inkubiert. Das Agarosegel wird hierbei gelöst, die DNS freigesetzt und an der Silikamatrix gebunden. Nach der Inkubation wurden die Röhrchen bei 13,000 rpm 2 Min. zentrifugiert, das Pellet je zweimal mit 500 µl QX1 bzw. PE-Puffer gewaschen (Entfernung von Salz u.a.) und bei RT getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 20 µl Aq dd_{PCR} resuspendiert, der Ansatz nach 5 Min. Inkubation zentrifugiert und der Überstand mit der eluierten DNS in ein neues Röhrchen überführt.

2.2.8.4. Klonierung von DNS Fragmenten

DNS Fragmente, die mit Taq-Polymerase amplifiziert wurden, haben i.d.R. einen kurzen Überhang von Adenosinresten an ihrem 3'-Ende. Durch die Verwendung von Vektorplasmiden mit Thymidin-Überhang lassen sich diese DNS Fragmente effizient klonieren. Diese Methode wird auch als TA-cloning bezeichnet.

Im vorliegenden Fall wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit der Firma Invitrogen für die Klonierung der DNS nach den Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurde mit *Vacciniavirus* Topoisomerase I "aktivierter" TA-Vektor (pCR[®]2.1) verwendet, der eine Ligation von DNA Fragmenten ohne Zugabe von DNA-Ligase erlaubt. Die Topoisomerase erkennt die Nukleinsäuresequenz C/T CCCTT, schneidet den DNS-Doppelstrang und bleibt über eine 3'Phosphotyrosyl-Bindung kovalent mit dem Vektor verbunden. Eine Selbstligation der Vektorenden wird dadurch verhindert. Nach Zugabe von PCR-Fragmenten, die 3'Adenosinüberhänge besitzen, ligiert die Topoisomerase Vektor und Insert (Sekiguchi and Shuman, 1994; Shuman, 1994). Für die Ligation wurden zwischen 0.5 µl und 4 µl amplifizierter DNS, 1 µl Salz-Lösung, 1 µl TOPO-Vektor und steriles Wasser gemischt (Endvolumen 6 µl). Die Reaktionsansätze wurde für 30 Min. (für

Fragmente > 1 kbp) bei RT inkubiert. Unmittelbar nach der Ligation wurden die Plasmide in Bakterien transformiert ("One Shot[®] chemically competent *E. coli*" (TOPO-TA Cloning Kit)). Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 6 µl der Plasmid-DNS vorsichtig vermischt und auf Eis 30 Min. inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 75 Sek. bei 42°C wurden die Bakterien für 2 Min. auf Eis überführt, darauf 250 µl SOC-Medium zugegeben und weiter für eine Stunde bei 37°C inkubiert. 50 µl der Transformationsansätze wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (75 µg/ml) sowie 40 µl X-Gal-Lösung (40mg/ml) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Galaktosidase-negative (weisse) Bakterienkolonien, die das Vektorplasmid einschließlich Insert enthalten, wurden selektiert.

2.2.8.5. Minipräparation von Plasmid-DNS

Plasmide wurden aus Bakterien mit Hilfe der alkalischen Lyse der Zellen präpariert (Birnboim, 1979). Selektierte Bakterien-Kolonien wurden ausgestochen und in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (75 µg/ml) ü.N. bei 37°C in einem Schüttelinkubator vermehrt. Das Pellet von 2 ml Bakterienkultur wurde in 200 µl gekühlter Lösung P1 resuspendiert, mit 200 µl Lösung P2 gemischt und für 2-3 Min. bis zur Lyse der Bakterienzellen inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung P3 zugegeben, gemischt und auf Eis 5-10 Min. inkubiert. Proteine und Bakterien-DNS wurden bei 13,000 rpm für 20-30 Min. bei 4°C sedimentiert und der Überstand, der die Plasmid-DNS enthält, in ein neues Gefäß überführt. Die Plasmid-DNS wurde mit 400 µl Isopropanol gefällt und nach einer Inkubation von 30 Min. bei RT 13,000 rpm für ca. 30 Min. bei 4°C pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das DNS-Pellet mit 200 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und schließlich mit 50 µl Aq dd_{PCR} gelöst. Plasmid-DNS wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.8.6. Spaltungen mit Restriktionsenzymen

Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Dabei wurden 0.1-0.2 µg Plasmid-DNS je Enzymverdau eingesetzt. Hierzu wurden 8 µl Enzympuffer mit den Restriktionsenzymen EcoRI oder BamHI/EcoRV und 2 µl der Plasmidpräparationen gemischt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die Analyse der

Reaktionsprodukte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese und anschließende Betrachtung unter UV-Licht.

2.2.8.7. DNS-Sequenzierung

DNS-Sequenzierungen wurden mit Hilfe der Kettenabbruchsmethode nach Sanger (Sanger et al., 1992) durchgeführt. Dabei wird die zu sequenzierende DNS denaturiert, mit einem Primer hybridisiert und dieser anschließend mit Hilfe einer DNS-Polymerase verlängert. Zusätzlich zu den vier 2'-Desoxynukleotiden (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) enthält jeder Ansatz eine definierte Menge eines 2',3'-Dideoxynukleotids (ddNTP), dem am dritten C-Atom des Riboserestes die Hydroxyl-Gruppe fehlt, an welche das nächste Nukleotid gebunden wird. Durch den statistischen Einbau eines ddNTP erfolgt ein Abbruch der DNS Synthese an einer Position, die spezifisch für das eingesetzte ddNTP ist.

Für die Nukleinsäuresequenzierungen wurde das "thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit" (Fa. Amersham TM) verwendet. Für jedes zu sequenzierende DNS-Fragment wurden drei unabhängige Klone eingesetzt. Für die Sequenzierungsreaktionen wurden 100-200 ng des zu sequenzierenden Plasmids mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Primer (M13 IR oder M13R IR (2 pmol)) (Williams und Soper, 1995) gemischt und danach auf vier Reaktionsansätze mit jeweils einem der ddNTPs verteilt. Die verwendeten Primer haben ihre Bindungsstellen in der Vektor DNS flankierend zu der insertierten DNS. Durch diese Sequenzierungsstrategie lassen sich die Nukleinsäuresequenzen beider Stränge der DNS unabhängig voneinander ermitteln. Die Sequenzierungsreaktionen wurden in einem Thermocycler (Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 6) durchgeführt. Die Proben (Stopplösung, Auftragepuffer) wurden bis zum Auftragen auf Sequenzgel bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

2.2.8.8. Auftrennung der DNS im Sequenzgel

Für die Auftrennung der Kettenabbruchfragmente wurden ein 4%-ige denaturierende Polyacrylamidgele (s.o.) mit einer Dicke von 0.25 mm und einer Länge von 60 cm verwendet. Nach 2 Stunden Polymerisationszeit wurden die Gele in den mit einem Laser ausgerüsteten Li-COR 4000L Sequenzierautomaten verbracht (Fa. MWG-Biotech) und ein Vorlauf von ca. 45 Min. bei einer Leistung von 50 W durchgeführt. Als Laufpuffer wurde

1x TBE verwendet. Je 1 µl der Sequenzreaktionen wurden aufgetragen und ü.N. bei 45°C, 2 kV, 50 W aufgetrennt. Die Fluoreszenzemission der Primer wurden während der Elektrophorese detektiert, gespeichert und schließlich mit der gerätespezifischen Software analysiert.

2.2.8.9. Auswertung der Sequenzdaten

Nach der Elektrophorese wurde die Qualität der ermittelten Sequenzen überprüft und Fehler bei der Erkennung der Sequenz durch die Software manuell korrigiert. Durch Vergleich der beiden DNS Stränge aller drei unabhängigen Klone, die zur Sequenzierung eines Fragments verwendet wurden, konnte eine Konsensussequenz erstellt und für die nachfolgenden Analysen eingesetzt werden.

Reagenzien	Reaktionsbedingungen
Plasmid-Primer Mix Primer M13 IR 2 µl (2 pmol) Plasmid x µl (100-200 ng) Aq dd _{pCR} <u>x µl</u> 26 µl	Startdenaturierung: 94°C-1.5 Min. 30 Zyklen Denaturierung: 92°C-30 Sek. Primer-Annealing: 56°C-30 Sek. Elongation: 72°C-30 Sek.
Primer M13rev IR 2 µl (2 pmol) Plasmid x µl (100-200 ng) Aq dd _{pCR} <u>x µl</u> 26 µl	Abkühlung: 15°C-30 Sek.
ddNTP-Mix ddGTP-Mix 2µl Plasmid-Primer Mix <u>6µl</u> 8µl ddATP-Mix 2µl Plasmid-Primer Mix <u>6µl</u> 8µl ddTTP-Mix 2µl Plasmid-Primer Mix <u>6µl</u> 8µl ddCTP-Mix 2µl Plasmid-Primer Mix <u>6µl</u> 8µl	Zugabe von 4 µl Stopplösung Inkubation: 70°C-2 Min. Abkühlung: 4°C

Tabelle 6.: Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die DNS-Sequenzierung.

2.2.8.10. Phylogenetische Analysen

Phylogenetische Analysen wurden mit dem HUSAR-Programmpaket am Großrechner des deutschen Krebsforschungszentrum (DFKZ) in Heidelberg durchgeführt. Das HUSAR-Paket stellt neben verschiedenen GCG Programmen (Devereux et al., 1984) das PHYLIP-Programm (Felsenstein, 1985; Felsenstein, 1993), u.a.) für den phylogenetischen Vergleich von Nukleinsäuresequenzen zur Verfügung. Zusätzlich zu den im Rahmen der Arbeit ermittelten Sequenzen wurden publizierte Sequenzendaten verwendet, die aus der Genbank extrahiert wurden (s. o).

Multiple "alignments" von Sequenzen mit Hilfe der Programme PILEUP (weniger als 100 Sequenzen) bzw. CLUSTAL (mehr als 100 Sequenzen) bildeten die Basis für die vergleichenden Analysen. Ausgehend von den alignments wurden paarweise Sequenzvergleiche durchgeführt und der Grad der genetischen Divergenz (genetische Distanz) nach der Kimura 2-Parameter Methode berechnet (Kimura, 1980). Phylogenetische Bäume wurden auf der Basis der Distanzmatrix mit Hilfe der Neighbour-Joining-Methode erzeugt (Saitou und Nei, 1987). Zur statistischen Absicherung der erhaltenen Gruppierungen wurden Bootstrap-Analysen (Felsenstein, 1985; Felsenstein, 1998; Felsenstein 1993) mit jeweils 1000 replikativen Datensätzen durchgeführt (Efron et al., 1996; Hedges, 1992)

2.2.9. Herstellung monoklonaler Antikörper

2.2.9.1. Produktion des rekombinanten Glykoproteins E2

Die Expression des Glykoproteins E2 erfolgte mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems in SF-21 Insektenzellen. Die rekombinanten Baculoviren (AcNPV-CP7/E2, AcNPV-890/E2 und AcNPV-Gi-1/E2) wurden von P. Becher (Giessen) bzw. B. Makoschey (Boxmeer) zur Verfügung gestellt. AcNPV-CP7/E2, AcNPV-890/E2 exprimieren das komplette Glykoprotein E2 von BVDV-1 CP7 bzw. BVDV-2 890, während AcNPV-Gi-1/E2 ein C-terminal verkürztes E2 von BVDV-2 Gi-1 ohne den mutmaßlichen Membrananker exprimiert.

SF-21 Insektenzellen wurden in T75 Kulturflaschen (Fa. Falcon) bei einer Zelldichte von ca. 1×10^5 Zellen/ml mit den rekombinanten Baculoviren in 3 ml Medium (sf 900 II SFM) infiziert (m.o.i. zwischen 1 und 10). Nach einer Stunde Inkubationszeit wurden die Kulturen auf 12 ml mit sf 900 II SFM Medium aufgefüllt und bei 27°C für 4-5 Tage inkubiert. Rekombinantes AcNPV wurde nach 4-5 Tage geerntet (Überstand) und die infizierten Zellen für die Gewinnung des Glykoproteins E2 verwendet. Die Überprüfung der E2-Expression erfolgte mit Hilfe von Immunoblots (s.u.) und indirekter Immunfluoreszenz (mAk D5).

2.2.9.2. Extraktion von rekombinantem Glykoprotein E2 aus Insektenzellen

Pelletierte infizierte SF-21 Zellen wurden mit Extraktionslösung (s.o.) resuspendiert und ca. 16 Stunden bei 4°C rotiert. Die Zellkerne ließen sich danach bei 3,200 rpm 15 Min. abzentrifugieren. Die Überstände (Zellextrakte) wurde gesammelt und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.9.3. Bestimmung der Proteinkonzentration (BC-Mikroassay)

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen wurde der "BC Assay: protein quantitation kit (Enhanced protocol)" (Fa. Uptima) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Die Proben wurden hierzu mit PBS 1:50 bzw. 1:100 verdünnt. Für die Standardkurve wurde BSA (2 mg/ml Stammlösung, Fa. Uptima) in Konzentrationen von 5 µg/ml bis 500 µg/µl in PBS verwendet. Die Reagenzien A und B aus dem Kit wurden im Verhältnis 50:1 gemischt und jeweils 200 µl in Röhrchen vorgelegt. 25 µl der verdünnten Proben wurde dazugegeben und nach einer Inkubation von 30 Min. bei 60°C die Extinktion zwischen 540 und 590 nm photometrisch gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte anhand der BSA-Standardkurve.

2.2.9.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden die SDS-PAGE Systeme nach Schagger und von Jagow (Schagger und von Jagow, 1987) bzw. nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet (Sammelgel 4% Acrylamid, Trenngel zwischen 8 und 10% Acrylamid, Gelstärke 1.5 mm). Die Elektrophorese wurde mit einer vertikalen Plattenapparatur (BIO

RAD) durchgeführt. Proteinproben wurden in 4xVD-Proteinauftragspuffer aufgenommen und 3-5 Min. auf 95°C erhitzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung von 50-80 V (Sammelgel) und 100-150 V (Trenngel). Die Behandlung der Gele nach der Elektrophorese richtete sich nach der weiteren Verwendung.

2.2.9.5. Proteinfärbung

2.2.9.5.1. Coomassiefärbung von Proteinen

Die Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese mit Färbelösung (s.o.) für 1 Stunde inkubiert, danach mehrfach mit Entfärbelösung (s.o.) gewaschen und schließlich zwischen zwei Cellophanblättern getrocknet.

2.2.9.5.2. Silberfärbung von Proteinen

Das "Silver Stain Kit for Proteins" der Firma Fluka wurde für Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen (Rabilloud, 1990; Swain und Ross, 1995) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Hierzu wurden Gele mit "Fixing solution" für 10 Min. fixiert und danach mit Aq dd für 10 Min. gewaschen. Die Gele wurden in "Fix/Sensitizing solution" für 5 Min. inkubiert, in der Folge für jeweils 20 Min. mit 40% Ethanol sowie Aq dd gewaschen, dann in "Sensitizing solution" für 1 Min. inkubiert und darauf erneut für 1 Min. mit Aq dd gewaschen. Abschließend wurden die Gele mit "Silver solution" für 20 Min. gefärbt und danach für 1 Min. mit Aq dd gewaschen. Die Entwicklung der Silber-Färbung erfolgte für 5-15 Min mit "Developing solution" und wurde mit "Stop solution" beendet. Die Gele wurden dreimal mit Aq dd gewaschen (je 5 Min.) und zur Konservierung zuerst für 5 Min. in "Preserving solution" inkubiert und schließlich zwischen zwei Cellophanblättern getrocknet.

2.2.9.6. Immunoblot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit dem SDS-PAGE-System nach Schägger und von Jagow (Schägger und Jagow, 1987). Nach der Elektrophorese wurden die Gele 10 Min. in Transferpuffer äquilibriert und danach bei konstanter Stromstärke von 100 V für eine Stunde in einer Transferapparatur (BIO-RAD) gemäß der Vorschrift des Herstellers auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Nitrozellulosemembran wurden mit 1%

Magermilchpulver in PBS-Tween für ca. eine Stunde geblockt, zweimal mit PBS gewaschen und über Nacht mit dem ersten Antikörper (Verdünnung der mAk 1:5 bis 1:10 in PBS, 0.05% (v/v) Tween 20) inkubiert. In der Folge wurden die Membranen jeweils 30 Min. mit PBS, mit 1M NaCl in PBS und mit PBS, 0.05% (v/v) Tween 20 gewaschen. Zur Detektion der Antikörperbindung wurden die Nitrozellulosemembranen für 2 Stunden mit einem Ziege anti-Maus Meerrettichperoxidase Konjugat (1:10,000 in PBS, 0.05% (v/v) Tween 20)) inkubiert und schließlich einmal 30 Min. mit 1M NaCl in PBS und einmal eine Stunde mit PBS, 0.05% (v/v) Tween 20 gewaschen. Die Entwicklung der Signale erfolgte mit dem "SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate" (Fa. PIERCE) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung eines Autoradiographiefilms (KODAK Biomax).

2.2.9.7. Reinigung monoklonaler Antikörper

Für die Herstellung der Immunoaffinitätssäulen wurde zunächst der mAk D5 gereinigt. Hierzu wurden Überstände von Hybridomzellkulturen mit Puffer A umgepuffert. Die mAk-Lösungen wurden durch Filter mit 0.45µm Porenweite (Nalgene) vorgeklärt. Vorgefertigte Säulen mit 1 ml Protein G-gekoppelter Sepharose (Fa. Pharmacia) wurden mit 10-15 Volumina Puffer B gewaschen. Danach wurde die mAk-Lösung in einem geschlossenen Kreislauf für ca. 16 Stunden über die Säulen gepumpt (Flussrate 1ml/Min.) und anschließend der Durchlauf verworfen. Die Säulen wurden mit 10-15 Volumina Puffer B gewaschen. Die Elution der adsorbierten mAk erfolgte mit 15 Volumina Elutionspuffer. Elutionsfraktionen von ca. 1ml wurden aufgefangen und sofort mit 1/10 Volumen Puffer C neutralisiert. Die Säulen wurden anschließend mit 15-20 Volumina Puffer B gewaschen und bis zur Wiederverwendung in 20%-iger Ethanol-Lösung bei 4°C gelagert.

Eluierte mAK wurden unter Verwendung von Mikrozentrifugenröhrchen (CentriPrep, 30 kD Ausschlußgröße, Fa. Amicon) eingeeengt und gleichzeitig in PBS umgepuffert. Konzentrierte mAk wurden bei -70°C gelagert.

2.2.9.8. Herstellung der Immunoaffinitätssäulen (Kopplung von D5 an Protein G-Sepharose)

Protein G Sepharose[®] 4 Fast Flow (Fa. Amersham Biosciences) wurde mit gereinigtem mAk D5 kovalent gekoppelt (Schneider et al., 1982). Hierzu wurde Protein G-Sepharose in 15 ml

Falcon-Röhrchen überführt, 2 mal mit 10 Volumina Puffer A (s.o.) gewaschen und jeweils 5 Min. bei 4,000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde in mAk Lösung (12 mg mAk D5/ je ml Protein G-Sepharose in 10 Volumina Puffer A gelöst) resuspendiert und ü.N. bei 4°C rotiert. Darauf wurde die Sepharose pelletiert, 3mal mit Puffer B gewaschen, in 10 Volumina resuspendiert und 100 µl zur späteren Untersuchung entnommen. Die Kopplungsreaktion wurde durch Zugabe von Puffer C gestartet und nach einer Stunde durch Abzentrifugieren beendet. Das Pellet wurde 2mal mit Puffer D gewaschen und danach in Puffer D bei RT 2 Stunden inkubiert (unter Rotation). Erneut wurden 100 µl für die spätere Untersuchung entnommen. Nach der Inkubation wurden die Beads 2mal mit 10 Volumina Puffer A gewaschen und schließlich in Puffer A incl. 0.05% NaN₃ bei 4°C aufbewahrt.

Die vor und nach der Kopplungsreaktion entnommenen Proben wurden im SDS-PAGE Gel unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Bei erfolgreicher Kopplung der mAk an das Säulenmaterial darf bei der Auftrennung keine der Bande, die der schweren Kette des gekoppelten IgG entspricht, auftreten (Harlow, 1988).

2.2.9.9. Reinigung des rekombinanten Glykoproteins E2

Die Reinigung des rekombinanten E2-Glykoproteins erfolgte unter Verwendung von Immunoaffinitätssäulen. Hierzu wurde mit dem mAk D5 gekoppelte Protein G-Sepharose auf eine Säule (Column C10/10, Fa. Amehrsam Biosciences) geladen und die Matrix zunächst mit 10 Vol. Elutionspuffer und danach mit 10 Vol. Puffer 3 gewaschen. Überstände (rE2 von Gi-1) bzw. Extrakte (r E2 von CP7 bzw. 890) infizierter Insektenzellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1mM PMSF versetzt. Die rE2-haltigen Lösungen (30 ml) wurden für 4 Stunden bei 4°C über die Immunoaffinitätssäule geschickt (Flussrate 1ml/min) und die Säulen danach mit jeweils 10-15 Volumina der Puffer 1, 2 und 3 gewaschen. Die Elution des gebundenen rE2 erfolgte mit 15-20 Volumina Elutionspuffer. Fraktionen von jeweils 1 ml wurden aufgefangen und sofort mit 1/10 Volumen 1M Tris-HCl pH 8 neutralisiert.

Die Immunoaffinitätssäulen wurde mit 15-20 Volumina Puffer 3 gewaschen und in PBS, 0.05% NaN₃ bei 4°C gelagert.

Die Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe des Immunoblots untersucht und positive Fraktionen unter Verwendung von Mikrozentrifugenröhrchen (CentriPrep, 30 kD

Ausschlußgröße, Fa. Amicon) eingeeengt, gleichzeitig in PBS umgepuffert und bei -70°C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden im BC-Assay (s.o.) bestimmt.

2.2.9.10. Gewinnung monoklonaler Antikörper

Die Arbeiten für die Gewinnung monoklonaler Antikörper wurden nach Harlow, Howard und Lindl durchgeführt (Harlow, 1988; Howard, 2001; Lindl, 2002).

2.2.9.10.1. Immunisierung von Mäusen

Als Antigene für die Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen das E2-Glykoprotein von Pestiviren wurde gereinigtes rE2 (Isolate CP7, 890 und Gi-1) verwendet. Jeweils 2-3 weibliche, 6 Wochen alte Balb/c-Mäuse wurden mit je 3 μg Protein je Immunisierung inokuliert. Als Adjuvans wurde komplettes Freundsches Adjuvans (erste Immunisierung) bzw. inkomplettes Freundsches Adjuvans (folgende Immunisierungen) benutzt. Mäuse wurden nach dem u.a. Schema (Abb. 3) immunisiert.

2.2.9.10.2. Gewinnung, Konservierung und Ausplattierung von Feeder-Zellen

Das klonale Wachstum einzelner frisch fusionierter Hybridome ist meist unzureichend. Die Hybridome benötigen u.a. Wachstumsfaktoren wie IL-6 sowie Spurenelemente wie Selen und sind empfindlich gegenüber Zelltoxinen. Verbessert werden kann das Wachstum durch den Einsatz von "Feeder" Zellen, z.B. Thymozyten, Fibroblasten oder Makrophagen, die mit den fusionierten Zellen kokultiviert werden. Alternativ können filtrierte Überstände von Feeder Kulturen zur Stimulierung des Hybridomwachstums verwendet werden (Howard, 2001).

Ein bis zwei Wochen vor der Fusion wurden Peritoneal-Exsudat-Zellen von Balb/c Mäusen als Feeder-Zellen gewonnen. Die Euthanasie der Mäuse erfolgte nach der Betäubung mit Äther durch cervikale Dislokation. Die Mäuse wurden in 70% Ethanol getaucht und auf Styropor fixiert. Nach der Desinfektion wurde die Haut vom Xyphoid bis zur Inguinalregion gespalten und die abdominale Muskelschicht frei präpariert ohne die Bauchhöhle zu eröffnen. 5 ml HEPES-Medium wurden unter das Peritoneum gespritzt. Der

Bauch wurde leicht massiert und die Flüssigkeit mit der Spitze abgesaugt. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt.

Gewonnene Zellen wurden gezählt und in Aliquots von 1×10^7 Zellen/ml eingefroren. Um die Sterilität der Präparationen zu testen wurden 2×10^6 Zellen ausplattiert und für 10 Tage kultiviert.

Einen Tag vor der Fusion wurde jeweils 1 Aliquot Feeder Zellen auf 5 *96well* Platten (in 100 µl Fusions-Medium/Vertiefung) ausplattiert.

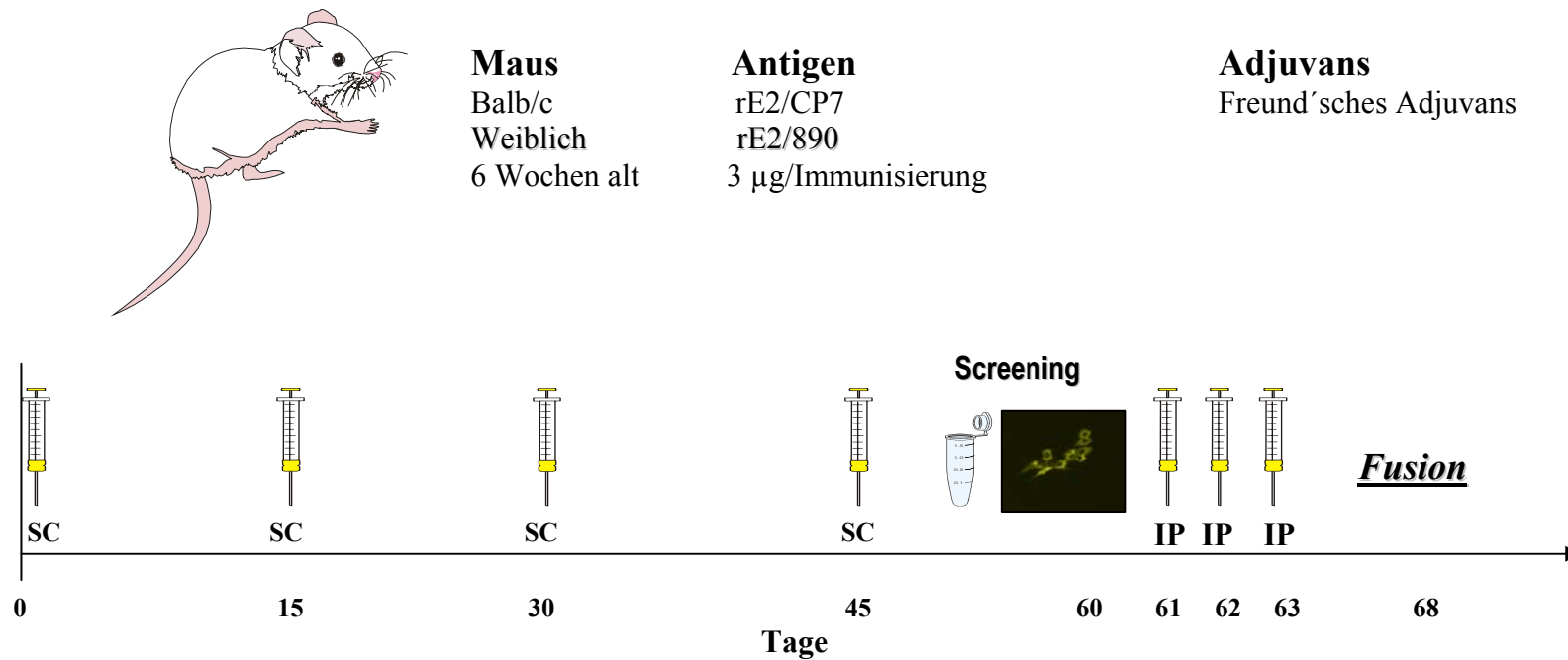


Abb. 3: Schematische Darstellung der Immunisierung von Mäusen für die Gewinnung monoklonaler Antikörper. Weibliche 6 Wochen alte Balb/c Mäuse wurden an den Tagen 0, 15, 30 und 45 subkutan (s.c.) mit rE2 (3µg pro Applikation in 50µl PBS und 50µl Freund'schem Adjuvans) von zwei BVDV-Stämmen immunisiert. 15 Tage nach der letzten Immunisierung wurde Blut entnommen und Serum gewonnen, das mittels Immunfluoreszenz auf Antikörpern gegen E2 getestet wurde. Mäuse mit hohem Antikörper-Titer wurden dreimal im Abstand von je 24 Stunden intraperitoneal (i.p.) mit rE2 (3µg in 100 µl PBS) immunisiert. 3 bis 5 Tage nach der letzten Immunisierung wurden Milzzellen für die Fusion gewonnen.

2.2.9.10.3. Gewinnung der Splenozyten (Milzzellen)

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch cervikale Dislokation nach Betäubung mit Äther. Zur Entnahme der Milz wurden die Mäuse auf dem Rücken fixiert, nach Desinfektion mit 70% Ethanol die Haut vom Xyphoid bis zur Inguinalregion durchtrennt und die Bauchmuskulatur freipräpariert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Milz steril entnommen und in eine Petrischale mit 10 ml Hepes-Medium gegeben. Das noch anhaftende Bindegewebe wurde entfernt und die Milzkapsel an einem Pol eröffnet. Die Milzpulpa wurde vorsichtig durch die vorgenannte Öffnung herausgespült. Hierzu wurde die Kanüle einer mit Hepes-Medium gefüllten 10 ml Spritze am entgegengesetzten Pol der Milz durch die Kapsel gestochen und bei geringem Druck gespült. Der Vorgang wurde bis zu einer deutlichen Entfärbung der Milz wiederholt. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach kurzer Zeit sedimentierten die größeren Gewebestücke und der ÜS wurde in eines neues 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Die Splenozyten wurden bei 3,000 rpm für 5 Min. zentrifugiert und zweimal mit Hepes-Medium gewaschen.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot 1:10 mit Türk's-Färbelösung versetzt und in einer Zählkammer nach *Neubauer* (Fa. Assistant) unter einem Umkehrmikroskop ausgezählt.

2.2.9.10.4. Fusion von Splenozyten und Myelomzellen

Zur Fusion wurde die Myelomzelllinie SP 2/0 verwendet. Diese wurden im Verhältnis 1:1 (1×10^7 Myelomzellen: 1×10^7 Splenozyten) zu den Splenozyten gegeben. Die Zellen wurden bei 3,000 rpm für 4Min.pelletiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurde dem Pellet über einen Zeitraum von einer Minute unter leichtem Schwenken in einem 37°C Wasserbad 1ml PEG 1500 Lösung zugegeben. Danach erfolgte zur Verdünnung des PEG die Zugabe von 1 ml Hepes-Medium nach 60 Sek., 3 ml Hepes-Medium nach 90 Sek. und 10 ml Hepes-Medium nach 2 Min. Die fusionierten Zellen wurden bei 300 g für 5 Min pelletiert, in 100-150 ml Hybridom-Medium resuspendiert und auf 10-15 Mikrotiterplatten mit Feeder Zellen (100 µl/Vertiefung) verteilt. Die Platten wurden 1 bis 2 Tage im Brutschrank inkubiert.

2.2.9.10.5. Selektion von Hybridomzellen

Die bekannteste Methode für die Selektion von Hybridomzellen ist die Verwendung von Myelomzelllinien, denen das Enzym Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (HGPRT) fehlt. Bei Kultivierung dieser Zellen in HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) blockiert Aminopterin die Biosynthese von Nukleotiden. Hybridomzellen produzieren HGPRT und können, wenn das Medium mit Hypoxanthin und Thymidin supplementiert ist, auf einem alternativen Weg Nukleotide synthetisieren (Harlow, 1988; Howard, 2001).

Zur Selektion wurde das Medium der ausplattierten Zellfusionen nach 1 oder 2 Tagen Inkubation auf HAT-Medium (s.o.) umgestellt. Im Abstand von 2 bis 3 Tagen wurden Platten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch auf das Wachstum von Zellkolonien kontrolliert, um den geeigneten Zeitpunkt für die Untersuchung der gewachsenen Hybridzellkolonien auf die Produktion von Antikörpern zu ermitteln. Nach ca. 9 Tagen Selektion wurde von HAT-Medium auf HT-Medium umgestellt und das erste Screening durchgeführt.

2.2.9.10.6. Screening von Hybridomzellen

Das erste Screening fand statt, nachdem die Klone etwa 30% des Bodens der Vertiefungen bedeckten, was nach etwa 10-14 Tagen der Fall war. Dazu wurden 200 µl Medium aus jeder Vertiefung abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Das abgenommene Medium wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf die Produktion virusspezifischer Antikörper untersucht. Hierfür wurden mit den BVDV Stämmen CP7, 890 und Gi-1 infizierte MDBK-Zellen verwendet. Die Platten wurden 72 Stunden nach der Infektion zweimal mit PBS gewaschen und mit Aceton-Methanol 1:1 für 20 Min. bei 4°C fixiert. Das Fixans wurde nach der Inkubation verworfen und der Zellrasen luftgetrocknet. Die fertigen Platten wurden bei RT oder 4°C bis zur Gebrauch aufbewahrt. Als Kontrollen wurden Platten mit nicht infizierten MDBK Zellen in gleicher Weise präpariert. Für das Screening wurden die Testplatten mit PBS rehydriert und mit 50 µl Hybridomüberstand je Vertiefung überschichtet. Nach einer Inkubation von 60 Min. wurden die Platten gewaschen und mit einem Ziege anti-Maus Cy3 Konjugat (s.o.) überschichtet (50 µl/Vertiefung). Die Auswertung erfolgte, nach abermaligem Waschen, unter einem

inversen Fluoreszenzmikroskop (s.o.). Zellklone (Mutterklone), die im IF-Test eine virusspezifische positive Reaktion zeigten, wurden auf neue Mikrotiterplatten (96well) umgesetzt.

2.2.9.10.7. Klonierung positiver Hybridome

Um die Monoklonalität der Zellkolonien zu gewährleisten wurden diese mehrfach rekloniert. Zuvor wurde zur Sicherung der Zellen mindestens eine Portion eingefroren. Für die Reklonierung wurde die "limited-dilution"-Methode angewandt. 96well-Platten wurden mit 100 µl Hybridom-Medium je Vertiefung (s. o.) beschickt. Zellen aus den als positiv identifizierten Vertiefungen (Mutterklone, s.o.) wurden vorsichtig resuspendiert, 50 µl der Zellsuspension in die erste Vertiefung A1 überführt. Ausgehend von der ersten Vertiefung wurde eine 1:3 Verdünnungsreihe in den Vertiefungen A1 bis H1 hergestellt. Danach wurden je 100 µl Hybridom-Medium in die vorgenannten Vertiefungen zugegeben. Ausgehend von der ersten Reihe wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe über zwölf Reihen mit einer Mehrkanalpipette hergestellt. Abschließend wurden weitere 100 µl Hybridom-Medium in jede Vertiefung pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 10 bis 14 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Zur Identifikation positiver Klone wurde die Immunfluoreszenz analog zum ersten Screening verwendet (s.o.). Sobald sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden sie erneut rekloniert. Dieses Verfahren wurde insgesamt 3-4mal wiederholt. Abschließend wurden von jedem Hybridzellklon Aliquots von ca. 10⁶Zellen/ml eingefroren.

2.2.9.10.8. Produktion von mAk

Klone, die stabil E2 spezifische mAk produzierten wurden auf Kulturschalen mit 25cm Durchmesser expandiert. Der Kulturüberstand von den Hybridomen wurde abgenommen, bei 3200 rpm geklärt und der zellfreie Überstand bei -20°C eingefroren.

2.2.9.11. Charakterisierung der monoklonalen Antikörper

2.2.9.11.1. Isotypisierung

Zur Isotypisierung der Antikörper wurde ein Isotyp-Bestimmungskit (ImmunoPure® Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (HRP/ABTS)) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dieser Kit ermöglicht eine schnelle und sensitive Bestimmung der Subtypen und Isotypen muriner monoklonaler Antikörper (IgA, IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃) sowie der leichten Ketten (κ und λ).

Der Nachweis basiert auf einem ELISA-Format mit fertig verdünnten Reagenzien. Für jede Typisierung wurden 10 Vertiefungen einer 96well ELISA-Platten mit 50 μ l "Coating Antibody Working Solution" beschichtet und ü.N. bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung entfernt und Vertiefungen mit 125 μ l "Blocking Solution" für eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach 4mal mit 125 μ l "Wash buffer" gewaschen. 50 μ l ÜS von Hybridomzellen wurde in 9 Vertiefungen pipettiert und 50 μ l der im Kit enthaltenen Positivkontrolle in die verbleibende 10. Vertiefung. Die Platten wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach 4x gewaschen. Nach Zugabe von 50 μ l der "class/subclass" spezifischen Kaninchen anti-Maus Ig Antiseren erfolgte eine weitere Inkubation von einer Stunde bei 37°C. Darauf wurden die Platten 4mal gewaschen und jede Vertiefung mit 50 μ l "Meerrettichperoxidase konjugierter Ziege anti-Kaninchen IgG "working Solution" beschickt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurden Platten erneut 4mal gewaschen und abschließend 100 μ l "ABTS Substrate Solution" in jede Vertiefung pipettiert. Die OD-Werte der Reaktionen wurden bei 405 nm photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen. OD-Werte zwischen 0.800 und 1.2 wurden als positiv eingestuft.

2.2.9.11.2. Test der mAk im Immunoblot

Die gewonnenen monoklonalen Antikörper wurden im Immunoblot zum Nachweis von E2 eingesetzt. Als Antigene wurde rE2 (Extrakte BVDV CP7 und 890 bzw. Kulturüberstand BVDV Gi-1) aus Insektenzellen, die zuvor mit Baculovirusrekombinanten infiziert wurden, und Zellextrakte von MDBK Zellen infiziert mit den BVDV Stämmen NADL, Deer-GB1 und RIT, verwendet.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (s.o.). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert und die gewonnenen mAk (Verdünnung 1:5) als erste Antikörper eingesetzt. Die weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.9.11.3. Reaktionsspektrum der mAk mit Pestiviren

Das Reaktionsspektrum der gewonnenen mAk gegen das E2 verschiedener Pestivirusstamme wurde mit allen zur Verfügung stehenden Virusisolaten (Laborstämme, Viren aus Impfstoffen und Feldvirusisolate) in der indirekten Immunfluoreszenz ermittelt. Hierzu wurden MDBK, SFT-R bzw. PK-15 Zellen mit folgenden Pestivirusstammen infiziert: BVDV-1a 200085, C86, Oregon, NADL; BVDV-1b Osloss, CP7, New York-1, 5785cp, RIT; BVDV-1c 519; BVDV-1d 721, BVDV-1e Deer-GB-1; BVDV-1f 11468; BVDV-1"e" S10; BVDV-1h Leon-6; BVDV-2a Gi-2cp, 890, SCP, ED; BVDV-2b Gi-4, Gi-5, Gi-6, Soldan; BDV-1a X818, BD-31; BDV-2 AZ79; BDV-3 Gifhorn; KSPV Alfort 187; sowie Virusisolate Giraffe-1 und Hobi (s.o.).

Für die zytopathogenen Virusstämme (C86, Oregon, NADL, Osloss, CP7, 5785cp, RIT, Gi-2cp, Giraffe-1) wurde zunächst eine Titerbestimmung (TCID₅₀) durchgeführt (s.o.). Danach wurden 50-200 TCID₅₀/Vertiefungen auf 96well Zellkulturplatten in 100 µl CCM-34 Kulturmedium ausplattiert. Nach Zugabe von 2 x 10⁴ MDBK Zellen/Vertiefungen in 100 µl Kulturmedium mit 10% FBS wurden die Zellkulturplatten für 3-4 Tagen bei 37°C inkubiert, anschließend gewaschen und mit Methanol/Aceton 1:1 (4°C, 20 min) fixiert. Die luftgetrockneten Zellen wurden bei 4°C gelagert.

Für die nzp Viren wurden zunächst Infektionen empfänglicher Zellen in Kulturschalen (10 cm Durchmesser) durchgeführt (s.o.). Die Zellen wurden nach 3 Tagen Inkubation trypsinisiert und mit nicht infizierten Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt. 1.5 x 10⁴ gemischte Zellen/Vertiefungen wurden in 96well Platten ausplattiert und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Fixierung und Lagerung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

Überstände von 4-5 Subklonen jedes gewonnenen mAk wurden in der indirekten Immunfluoreszenz getestet. Hierzu wurden je 50 µl in 8 Vertiefungen mit infizierten Zellen

(s.o.) pipettiert, 2 Stunden bei 37°C inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. Als Detektionsantikörper wurde ein Ziege anti-Maus Cy3 Konjugat (1:500 in ABDB-A Puffer, 50 µl/well) verwendet. Nach einer Stunde Inkubation und Waschschritten erfolgte die Auswertung unter einem Fluoreszenzmikroskop bei Grünanregung (ca. 552 nm). Nicht infizierte MDBK-Zellen wurden als negative Kontrolle bzw. Hybridom-Medium benutzt und ÜS von mAK D5 als positive Kontrolle.

2.2.9.11.4. Serumneutralisationstest (SNT) mit den gewonnenen mAk

Gereinigte mAk wurden gegen ausgewählte BVDV-1 und BVDV-2 Isolate im SNT getestet. Hierzu wurden 50 µl (1 mg/ml) mAk SCR4, SCR25, SCR60 und SCR95 im Doppelansatz in 96well Mikrotiterplatten in 3er Stufen titriert. Es folgte die Zugabe von 100 TCID₅₀ BVDV-1b Osloss bzw. BVDV-2a Gi-2cp in 50µl Kulturmedium ohne FBS. Nach 60 Min. Inkubationszeit wurden 4 x 10⁵ MDBK-Zellen/ml in Kulturmedium mit 15% FBS (50 µl/well) zugegeben. Die Auswertung erfolgte nach 3 Tagen durch mikroskopische Beurteilung des zpE, Titer wurden nach Spaerman und Kärber (Kärber, 1931) berechnet und als log₁₀ ND₅₀ angegeben.

2.2.9.11.5. Immunelektronenmikroskopie mit den mAk

2.2.9.11.5.1. Gradientenreinigung von Virionen

BVDV-1 NADL wurde in MDBK-Zellen (Medium ohne FBS) vermehrt und der Überstand infizierter Zellen durch Zentrifugation (3,200 rpm 5 Min.) sowie Filtration geklärt (0.45 µm Porendurchmesser). Der virushaltige Überstand wurde mit Hilfe eines Ultrafiltrationssystems "Amicon, Modell 52" (Ausshlußgröße der Membran 30 kD) auf ca. 1/60 des Ausgangsvolumens eingeeengt und das Retentat bei 4°C gelagert.

Die Gradienten-Reinigung von Virionen für EM-Immunomarkierungen wurde unter Verwendung eines 15 bis 30% (v/v in PBS) Iodixanol (OptiPrep[®]) Stufengradienten (5% Stufen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Probenmaterial wurde 1:1 mit 60% (v/v) Iodixanol gemischt und als letzte Stufe (30%) unterschichtet. Die 12 ml Gradienten wurden für 3-4 Stunden bei 55,000 rpm in einem 75Ti Rotor (Fa. Beckmann) zentrifugiert. Nach Abschluß der Zentrifugation wurden 0.5 ml Fraktionen vom Boden des Zentrifugenröhrchens aus mit Hilfe einer Schlauchpumpe gewonnen.

Die Fraktionen wurden in Immunoblot (s.o.) getestet. Ausgewählte positive Fraktionen wurden gepoolt und unter Verwendung von Mikrozentrifugenröhrchen (Ultrafree-4 Centrifugal Filter & Tube, 30 kD Ausschlußgröße, Fa. Amicon) auf 400 µl eingengt und gleichzeitig in PBS gepuffert.

2.2.9.11.5.2. Immunelektronenmikroskopie

Gereinigte Virionen wurden auf mit Pioloform beschichteten, kohlebedampften und beglimmten 400mesh Kupfer/Rhodiumnetzen (Fa. Plano) für 2-5 Min. adsorbiert. Die Trägernetze mit adsorbierten Virionen wurden zweimal mit 0.5% BSA in PBS gewaschen und mit den mAk SCR4, SCR25, SCR60, SCR95 in verschiedenen Verdünnung in PBS mit 0.5% BSA für 1 Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen der Netze mit PBS wurden sie mit Gold-konjugiertem Ziege anti-Maus Ig (10 nm Goldpartikel) für weitere 60 Min. inkubiert. Nach je dreimaligem Waschen mit defiz. PBS und Aq dd wurden die Präparate mit 2% (w/v) Methylaminwolframat für 30 Sek. kontrastiert und luftgetrocknet.

Die Auswertung der Präparate erfolgte in einem Zeiss EM 902 Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 KV und einer instrumentellen Vergrößerung von 30.000x. Aufnahmen der Präparate wurden auf Kodak SO-193 Planfilmen angefertigt.

2.2.9.11.6. Etablierung eines ELISA mit den gewonnenen mAk

2.2.9.11.6.1. Biotinylierung von mAk

Gereinigte mAk wurden mit Biotin (Fa. Roche) nach Angaben des Herstellers konjugiert. Für die Kopplung wurden Biotin-Lösung und mAk-Lösung in einem Volumenverhältnis von 1:1 eingesetzt (1 mg mAk und 4µl Biotin (12.5mg/ml) jeweils in 1 ml Na-Borat Puffer) und nach einer Stunde Inkubationszeit mittels Mikrozentrifugenröhrchen (Ultrafree-4 Centrifugal Filter & Tube, 30 kD Ausschlußgröße, Fa. Amicon) in PBS (1 ml) umgepuffert. Biotinylierte mAk wurden bei -20°C gelagert.

2.2.9.11.6.2. Etablierung eines *Antigen-Capture-ELISA* zum Nachweis und zur Quantifizierung des E2-Glykoproteins von Pestiviren

Ein Sandwich ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) System wurde zum Nachweis und zur Quantifizierung von E2-Glykoprotein von Pestivirus etabliert. Dabei wurden sowohl als Fänger (Capture)- als auch als Detektionsantikörper die neu gewonnenen mAk eingesetzt.

Hierzu wurden monoklonale Antikörper SCR4, SCR25, SCR60 und SCR95 auf der einen Seite als Fänger-Antikörper eingesetzt und dieselben mAk nach Biotinylierung auch als Detektionsantikörper in verschiedene Kombinationen getestet. Als Antigene wurden rE2 und Zellextrakte bzw. Überstände von mit unterschiedlichen Pestiviren infizierten Zelllinien verwendet.

Für die Etablierung des ELISA wurden 96well Mikrotiterplatten mit 200 ng/Vertiefung gereinigter mAk in PBS-0.02% NaN₃ beschichtet (Inkubation ü.N. bei 4°C). Nach der Inkubation erfolgte die Absättigung der Mikrotiterplatten mit 100 µl 5% BSA, 0.02% NaN₃ in PBS (bei RT, 2 Stunde). In jede Vertiefung wurden 50 µl Antigenlösungen (mit verschiedenen Antigenen und Konzentrationen) pipettiert und nach eine Stunde Inkubation bei RT 50µl der biotinylierten Detektions-Ak (500-50ng/ml) zugegeben. Nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 50 µl Streptavidin-PO. Schließlich wurden in jede Kavität 50 µl OPD-Substrat oder TMB-Substrat (Fa. Sigma) pipettiert. Zwischen den genannten Reaktionsschritte wurden die Platten je 3 - 4x mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Der Farbumschlag der Chromogene wurde photometrisch in einem ELISA-Reader bei 492-690 nm bestimmt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR hat sich in den vergangenen Jahren als eine der wichtigsten Methoden zum Nachweis von Pestiviren etabliert. Vorteile der RT-PCR sind die hohe Sensitivität, die u.a. die Untersuchung von Sammelproben zulässt und die hohe Spezifität, die eine Unterscheidung verschiedener Pestiviren ermöglicht. Die konventionelle RT-PCR erlaubt den schnellen qualitativen Nachweis einer Pestivirusinfektion. Durch Auswahl geeigneter Primer lässt sich auch eine Differenzierung von Vertretern unterschiedlicher Pestivirusspezies erreichen. Die Differenzierung der in der Rinderpopulation vorkommenden Pestiviren kann wichtige Grundlagen für die erfolgreiche Durchführung von BVDV/MD Bekämpfungsprogrammen liefern (Barlic-Maganja und Grom, 2001; Canal et al., 1996; Fulton et al., 1999; Ridpath und Bolin, 1998). Die bisher etablierten RT-PCR Protokolle berücksichtigen verschiedene Genombereiche (u.a. 5' NTR, E2, NS3 und NS5) (Hyndman et al., 1998; Rossmanith et al., 2001; Scheibner et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine diskriminierende RT-PCR etabliert, die den Nachweis von Pestiviren mit der gleichzeitigen Unterscheidung zwischen BVDV-2 und anderen Vertretern des Genus Pestivirus verbindet. Weiterhin wurde eine BVDV-1 spezifische RT-PCR entwickelt, die mindestens 7 der bekannten Subtypen von BVDV-1 abdeckt.

3.1.1. Diskriminierende BVDV-2 RT-PCR

Für die Entwicklung einer diskriminierenden RT-PCR wurde die 5' nicht-translatierte Region (5'NTR) des Pestivirusgenoms herangezogen, da für diesen Genombereich bereits zahlreiche Sequenzdaten publiziert wurden. Die Auswahl geeigneter Primer erfolgte unter Berücksichtigung von mehr als 200 pestiviralen Sequenzen (Daten nicht gezeigt). Die Nukleotidpositionen der BVDV-2 spezifischen Primer (Nukleotide 207 bis 225) beziehen sich auf die Sequenz von BVDV-2 890 (GenBank Zugangsnummer U18059).

Ausgehend von präparierter RNS wurde zunächst unter Verwendung eines pan-Pestivirus spezifischen Primers (Ol 380R) (Becher et al. 1998) cDNS synthetisiert. In der folgenden PCR wurde der vorgenannte Primer mit einem weiteren pan-Pestivirus spezifischen Primer

(Ol 100) (Becher et al., 1998) und drei BVDV-2 spezifischen Primern (S200a-c) kombiniert. Die Verwendung dreier BVDV-2 spezifischer Primer, die in der gleichen Region des viralen Genoms binden, wurde aufgrund der erheblichen Sequenzunterschiede von BVDV-2 Isolaten in diesem Bereich erforderlich. Alternativ wäre auch der Einsatz eines hochgradig degenerierten Oligonukleotids möglich gewesen. Die BVDV-2 spezifischen Primer decken alle bekannten BVDV-2 Sequenzen und die pan-Pestivirus Primer alle bekannten Pestivirus-Sequenzen ab. Als Ergebnis der diskriminierenden BVDV-2 RT-PCR können zwei spezifische Produkte entstehen: ein Amplifikat von 299 Bp zeigt das Vorhandensein eines Pestivirus in der untersuchten Probe an, während ein zusätzliches Amplifikat von 194 Bp charakteristisch für BVDV-2 ist (Abb. 4).

3.1.2. BVDV-1 spezifische RT-PCR

Eine BVDV-1 spezifische RT-PCR wurde im Bereich des N^{pro}-Gens etabliert, um beim Vorhandensein mehrerer Virusisolate in einer Probe BVDV-1 eindeutig identifizieren zu können. Die Auswahl der BVDV-1 spezifischen Primern (BVD1ra und BVD1rb) erfolgte unter Berücksichtigung von mehr als 150 pestiviralen Nukleinsäuresequenzen. Die Nukleotidpositionen der BVDV-1 spezifischen Primer (Nukleotide 211 bis 229) beziehen sich auf die ORF-Sequenz von Pestiviren.

Nach der cDNS Synthese unter Verwendung der BVDV-1 spezifischen Primer wurde in der nachfolgenden PCR der pan-Pestivirus Primer Ol 380 in kodierender Orientierung mit den BVDV-1 spezifischen Primern kombiniert und ein Amplifikationsprodukt von 244 Bp generiert. Mit dem beschriebenen Verfahren ließen sich alle getesteten Virusisolate aus 7 BVDV-1 Subgruppen nachweisen (Abb. 5).

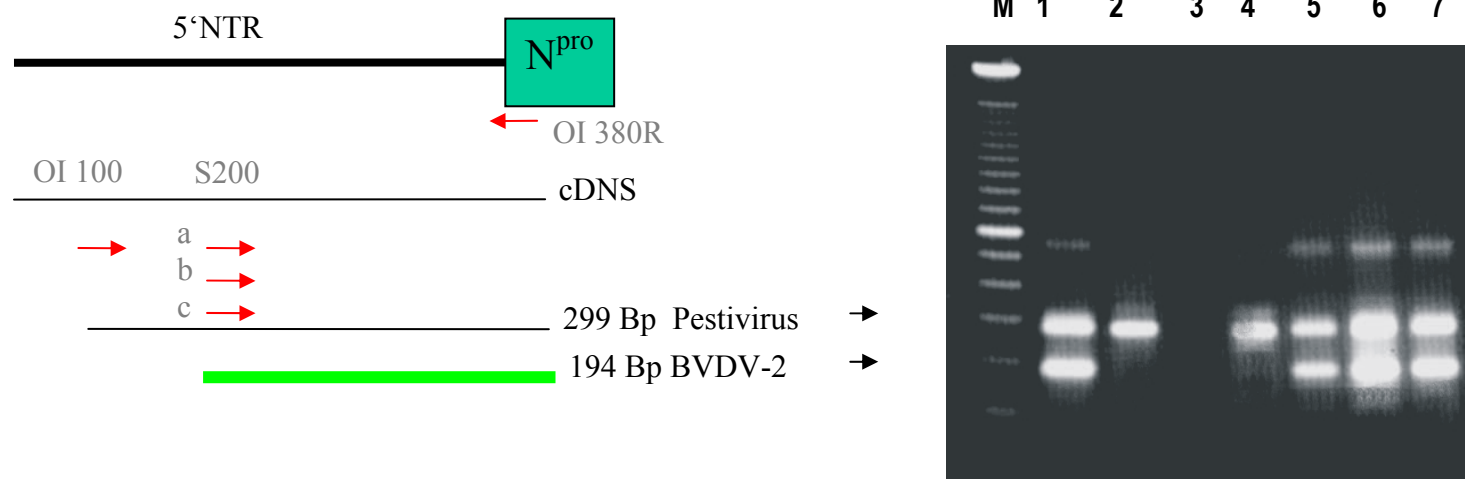


Abb. 4: Diskriminierende BVDV-2 RT-PCR. Die Auswahl geeigneter Primer erfolgte in der 5' nicht-translatierten Region (5'NTR) des Pestivirusgenoms unter Berücksichtigung von mehr als 200 Sequenzen. Ausgehend von der viralen RNS wird zunächst mittels eines pan-Pestivirus spezifischen Primers (OI 380R) cDNS synthetisiert. In der folgenden PCR wird der vorgenannte Primer zusammen mit einem weiteren pan-Pestivirus spezifischen Primer (OI 100) und drei BVDV-2 spezifischen Primern, welche die bekannten BVDV-2 Sequenzen abdecken, kombiniert. Ein Amplifikat von 299 Bp zeigt das Vorhandensein eines Pestivirus in der untersuchten Probe an; ein zusätzliches Amplifikat von 194 Bp ist charakteristisch für BVDV-2. **M.** Marker; **1.** BVDV2a/Gi-2; **2.** BVDV-1b/Osloss; **3.** nicht infizierte Zellen; **4.** BVDV-1f/11468; **5.** BVDV-2a/653; **6.** BVDV-2a/ 2230; **7.** BVDV2a/12815.

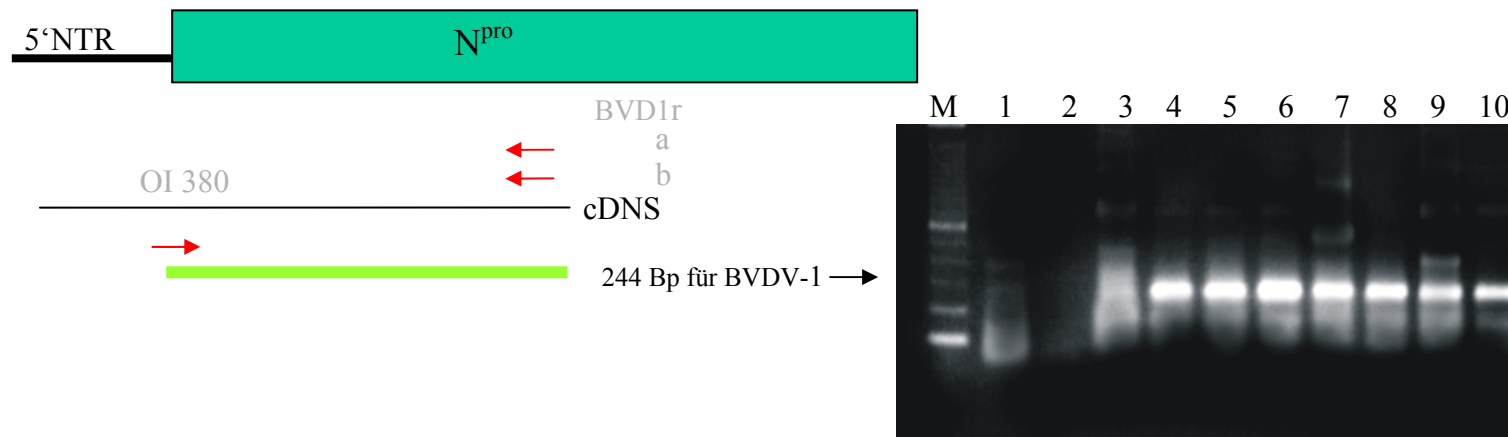


Abb. 5: Spezifische BVDV-1 RT-PCR. Die Auswahl der BVDV-1 spezifischen Primer erfolgte im 5'-terminalen Bereich des N^{pro}-Gens unter Berücksichtigung von mehr als 150 pestiviralen Sequenzen. Durch die Kombination von zwei BVDV-1 spezifischen Primern (BVD1r a und b) mit einem pan-Pestivirus spezifischen Primer (OI 380) wird für BVDV-1 Isolate ein Amplifikationsprodukt von 244 Bp generiert. **M.** Marker, **1.** BDV/X818, **2.** BVDV-2b/Gi-4, **3.** BVDV-2a/890, **4.** BVDV-1c/519, **5.** BVDV-1"e"/S10, **6.** BVDV1a/Paplit, **7.** BVDV1d/287-7KH, **8.** BVDV-1h/Leon-6, **9.** BVDV-1f/11468; **10.** BVDV-1b/Osloss.

3.2. Untersuchung von Virusisolaten mittels BVDV-2 diskriminierender RT-PCR und BVDV-1 spezifischer RT-PCR

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden u.a. Pestivirusisolate aus Deutschland aus den Jahren 1996-2002 untersucht. Die Isolate stammen aus diagnostischen Einsendungen an das Institut für Virologie und konnten im Rahmen der virologischen Labordiagnostik gewonnen werden. Nach einer Infektion von Kulturzellen mit den bei -70°C gelagerten Virusisolaten wurde aus den infizierten Zellen RNS gewonnen und in der RT-PCR eingesetzt. Die virushaltigen Kulturüberstände wurden für die spätere antigenetische Charakterisierung bei -70°C aufbewahrt. Insgesamt standen 293 Pestivirusisolate für die Untersuchung mit Hilfe der BVDV-2 diskriminierenden RT-PCR sowie der BVDV-1 spezifischen RT-PCR zur Verfügung (Tabelle 7).

Anzahl der Isolate	Spezies	Herkunftsland
276	Rind	Deutschland
7	Rind	England
2	Rind	Frankreich
1	Rind	Brasilien
2	Schaf	Deutschland
1	Antilope	Deutschland
4	Serumkontamination bzw. Zellkulturkontamination	Frankreich/Amerika Deutschland
293	Summe	

Tabelle 7. Pestivirus-Isolate, die mit verschiedenen Methoden untersucht wurden.

Von den 276 bovinen Pestivirusisolaten aus den Jahren 1996 bis 2002, die aus deutschen Beständen stammten, wurden 79% als BVDV-1 und 21% als BVDV-2 klassifiziert (Tab. 8)

Aus einigen der betroffenen Beständen konnten mehrfach Pestiviren isoliert werden, z.T. auch in verschiedenen Jahren. Daher ist es sinnvoll, die Ergebnisse der RT-PCR nach Beständen zu gliedern. Die untersuchten Pestivirusisolate stammten aus 154 Beständen. In 82.5% dieser Bestände wurde BVDV-1 und in 14.3% BVDV-2 gefunden. In 3.2% der Bestände waren sowohl BVDV-1 als auch BVDV-2 nachweisbar (Tab. 9).

Jahr	Untersuchte Isolate	BVDV-1	BVDV-2
2002	11	10 (90.9%)	1 (9.1%)
2001	21	15 (71.4%)	6 (28.6%)
2000	34	19 (55.8%)	15 (44.2%)
1999	52	48 (92.3%)	4 (7.7%)
1998	46	34 (73.9%)	12 (26.1%)
1997	84	67 (79.7%)	17 (20.3%)
1996	28	25 (89.3%)	3 (10.7%)
Summe	276	218 (79.0%)	58 (21.0 %)

Tab. 8: Klassifizierung von Pestiviren aus deutschen Rinderbeständen mittels RT-PCR (Isolate).

Jahr	Untersuchte Bestände	BVDV-1	BVDV-2	BVDV-1/BVDV-2
2002	4	3 (75%)	1 (25%)	
2001	10	9 (90%)	1 (10%)	
2000	13	9 (69.2%)	3 (23.0%)	1 (7.8%)
1999	31	27 (87.0%)	4 (13.0%)	
1998	33	23 (69.7%)	7 (21.2%)	3 (9.1%)
1997	43	38 (88.4%)	4 (9.3%)	1 (2.3%)
1996	20	18 (90.0%)	2 (10.0%)	
Summe	154	127 (82.5%)	22 (14.3%)	5 (3.2%)

Tab. 9: Klassifizierung von Pestiviren aus deutschen Rinderbeständen mittels RT-PCR (Bestände).

Neben den in Deutschland gewonnenen Virusisolaten aus Rindern wurden weitere Pestiviren unterschiedlicher Herkunft untersucht. 7 Pestivirusisolate aus England und 2 Pestiviren aus Frankreich ließen sich als BVDV-1 einordnen. Ein Virus aus einer Antilope (Antilope-G1), 2 Isolate aus kontaminiertem Serum (S10, S14) und ein Isolat aus einer kontaminierten Zellkultur (K7-00) wurden ebenfalls als BVDV-1 klassifiziert. Als Vertreter von BVDV-2 konnten ein brasilianisches Virusisolat aus dem Rind (Soldan) und ein Isolat aus einer kontaminierten Zelllinie (ED) eingestuft werden. Zwei Pestiviren aus Schafen (AZ79 und 17385) ließen sich mit Hilfe der verwendeten PCR-Methoden nicht eindeutig zuordnen (BVDV-1 negativ, BVDV-2 negativ, Pestivirus positiv).

3.3. Real time RT-PCR

Ein neueres Verfahren, dass sich zum Nachweis von Pestiviren einsetzen lässt, ist die real time RT-PCR. Der Nachweis von Amplifikationsprodukten erfolgt dabei in Echtzeit (Higuchi et al., 1993; Wittwer et al., 1997) und, im Unterschied zur konventionellen PCR, in der frühen logarithmischen Phase der Reaktion. Zu diesem Zeitpunkt sind die eingesetzten Reagenzien (Nukleotide, Primer, Sonden, Polymerase etc.) im Überschuss vorhanden und limitieren den Verlauf der Reaktion nicht. Der Nachweis erfolgt durch die Berechnung des sog. threshold cycle (Ct), d.h. des Reaktionszyklus, bei dem das gemessene Fluoreszenzsignal einen definierten Wert (threshold) überschreitet. Der Ct ist dabei proportional zur ursprünglich vorhandenen Menge an Ziel-DNS. Aus diesem Grund lässt sich die real time PCR zur Quantifizierung der in einer Probe enthaltenen Ziel-DNS Menge verwenden. Weitere Vorteile der real time PCR sind u.a. eine gesteigerte Empfindlichkeit und die Vermeidung von Kontaminationen durch Verzicht auf post PCR Schritte z.B., der Gelelektrophorese von PCR Produkten.

Bereits beschrieben wurden real time RT-PCR Verfahren u.a. zur Differenzierung zwischen KSPV und ruminanten Pestiviren (McGoldrick et al., 1998; Risatti et al., 2003), zur Identifikation von BVDV (Mahlum et al., 2002) und zur Differenzierung zwischen BVDV-1 und BVDV-2 (Bhudevi und Weinstock, 2001). Im Hinblick auf die genetische Variabilität von Pestiviren gelten die gleichen Einschränkungen wie bei der konventionellen RT-PCR.

Zur Detektion und Unterscheidung von Pestiviren wurde in der vorliegenden Arbeit eine real time RT-PCR unter Verwendung fluorochrommarkierter Sonden ("TaqMan[®] RT-PCR") etabliert. Die große Zahl verfügbarer Sequenzen aus dem Bereich der 5'NTR im Vergleich zu kompletten Sequenzen oder Teilsequenzen anderer Genomregionen (N^{pro}, E2, NS3 u.a.) führten zur Selektion der Primer und Sonden für den erstgenannten Bereich des Pestivirusgenomes. Zwei pan-Pestivirus Primer (PV-03R und PV-02) und zwei TaqMan[®] Sonden (PV-Taq01 und PV-Taq02) wurden unter Berücksichtigung von rund 155 Nukleinsäuresequenzen selektiert. Die Auswahl der Sonden und Primer erfolgte mit Unterstützung einer speziellen Software (Primer Express, Fa. ABI, Darmstadt). Die Sonde PV-Taq01 wurde so ausgewählt, dass sie insbesondere Amplifikate von BVDV-1 Isolaten nachweisen sollte, während die Sonde PV-Taq02 zur Detektion BVDV-2 spezifischer Amplifikate bestimmt war. Beide Sonden wurden mit unterschiedlichen Reporter-

Fluorochromen (PV-Taq01 TAMRA, PV-Taq02 VIC) markiert, um die gleichzeitige Verwendung in einem Reaktionsansatz (Multiplex real time PCR) zu ermöglichen.

3.3.1. SYBR[®]Green real time PCR

Ein Nachweisprinzip, das in der real time PCR verwendet wird, basiert auf dem Einsatz von Fluorochromen, die unabhängig von der Nukleinsäuresequenz an doppelsträngige DNS binden (SYBR[®]Green u.a.). Dadurch werden sowohl spezifische Amplifikationsprodukte als auch unspezifische Produkte insbesondere so genannte Primerdimere in gleicher Weise detektiert. Das Vorliegen von Primerdimeren, die aufgrund ihrer geringen Größe über eine niedrige Schmelztemperatur verfügen, kann anhand einer Schmelzkurve im Anschluss an die eigentliche PCR nachgewiesen werden (Wittwer et al., 1997).

Um die Spezifität und das Reaktionsspektrum der Primer PV-03R und PV-02 zu untersuchen, wurde zunächst eine real time PCR mit dem Fluorochrom SYBR[®]Green durchgeführt. Das erwartete Reaktionsprodukt dieser PCR hat eine Größe von ca. 150 Bp (z.B. 147 Bp für BVDV-1 CP7, 150 Bp für BVDV-2 890) und einen berechneten Schmelzpunkt von 82.5°C bis 87.5°C. Nach der reversen Transkription von cDNS unter Verwendung des Primers PV-03R konnten mit dem geschilderten Verfahren alle getesteten Pestivirusisolate detektiert werden. Das Reaktionsspektrum der Primer ist in der Tabelle 10 zusammengefasst. Abbildung 6a zeigt den Verlauf der PCR anhand der gemessenen Fluoreszenz. Beim anschließenden Aufschmelzen der Reaktionsprodukte ergab sich kein Hinweis auf das Vorliegen von unspezifischen Amplifikationsprodukten. Die unterschiedlichen Schmelzkurven der Amplifikate, dargestellt als Ableitung der gemessenen Fluoreszenz gegenüber der Temperatur, beruht auf der Heterogenität der Pestivirussequenzen in diesem Bereich (unterschiedliche T_m) (Ab. 6b). Die Reaktionsprodukte wurden anschließend durch eine Gelelektrophorese getestet, wobei ebenfalls keine unspezifischen Amplifikationsprodukte beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt).

Spezies, Subgruppe	Isolat	SYBR® Green	Sonde PV-Taq01	Sonde PV-Taq02
BVDV-2a	890	+	-	+
	ED	+	-	+
	635	+	-	+
	Gi-2	+	-	+
BVDV-2b	Gi-4	+	-	+
	Soldan	+	-	+
BVDV-1a	C86	+	+	+
	200085	+	+	+
BVDV-1b	CP7	+	+	-
	Osloss	+	+	-
BVDV-1c	519	+	+	+
BVDV-1d	287-7KH	+	+	+
	14658	+	+	+
BVDV-1e	Deer-GB1	+	+	-
BVDV-1f	10558	+	+	-
	12482	+	+	-
BVDV-1 e	S10	+	+	-
BVDV-1h	Leon-6	+	+	+
BDV-1a	X818	+	+	+
BDV-2	V60 (Reindeer-1)	+	+	+
	AZ79	+	+	+
	17385	+	+	+
BDV-3	Gifhorn	+	+	+
KSPV	Brescia	+	-	-
Giraffe	Giraffe-1	+	-	+
Hobi	Hobi	+	-	+

Tab. 10: Reaktionsspektrum von Primern (SYBR®Green) und Sonden in der SYBR®Green und TaqMan® RT-PCR.

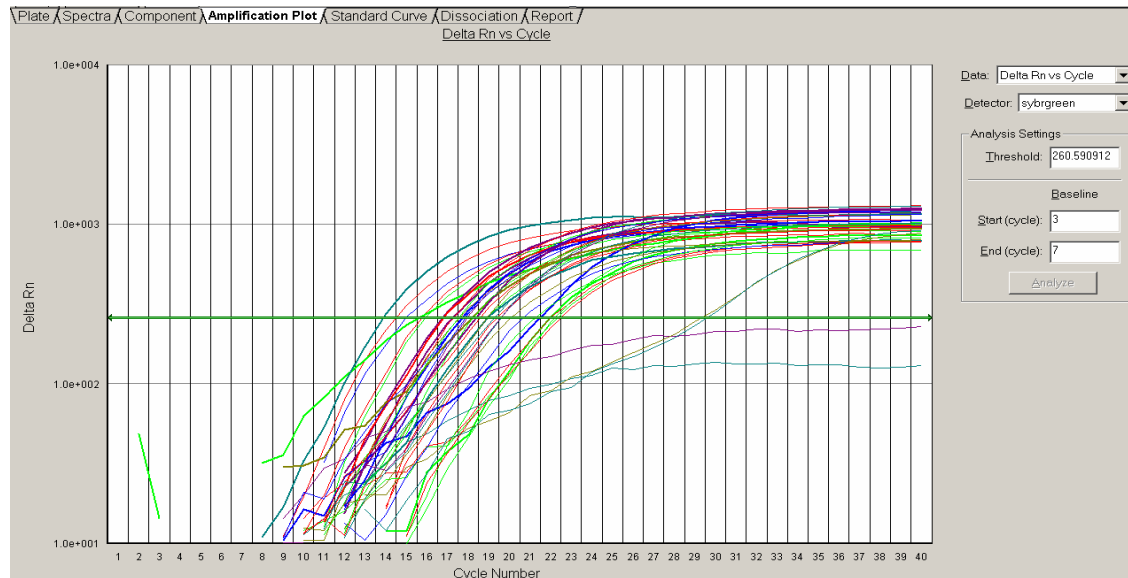
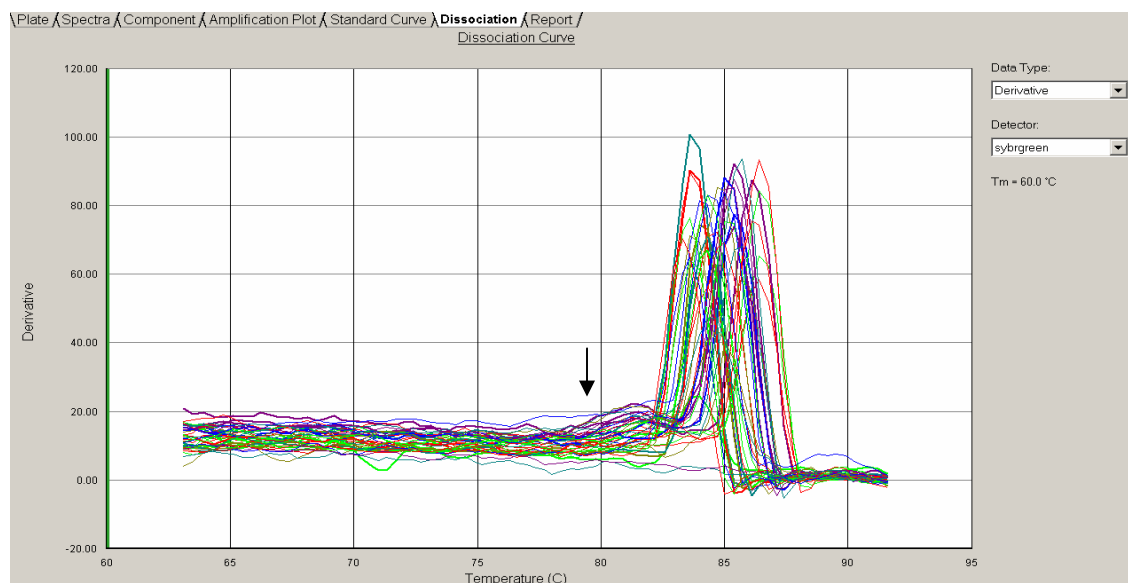
a**b**

Abb. 6: Reaktion der ausgewählten Primer (SYBR® Green) und Schmelzprofile der Amplifikate. a: 21 Pestivirusisolate (BVDV-1, BVDV-2, KSPV, BDV, Stamm Giraffe-1 und Hobi s. Tab. 10) wurden mit den selektierten Primern getestet. Die Proben wurden als Duplikate eingesetzt. Alle Isolate wurden amplifiziert (die Fluoreszenzsignale (türkis und violett) unterhalb der threshold-Ebene (grüne Linie) entsprechen den NTCs (non target controls) ohne spezifische RNS) **b:** Unterschiede im Schmelzprofil der Amplifikate reflektieren die Heterogenität der Sequenzen in der 5' NTR. Der Pfeil deutet auf den Temperaturbereich, in dem Primerdimere aufschmelzen.

3.3.2. TaqMan[®] RT-PCR

Einen erheblichen Fortschritt in der Verbesserung der Spezifität der real time PCR stellt die Einführung von fluorochrommarkierten Sonden dar (Holland et al., 1991). Hierzu werden Oligonukleotidsonden verwendet, die sequenzspezifisch an die amplifizierte Ziel-DNS binden. Diese Sonden sind mit zwei Fluorochromen markiert: einem *Reporter*-Fluorochrom am 5' Ende und einem *Quencher*-Fluorochrom am 3' Terminus. Im intakten Zustand der Sonde wird nach Anregung des *Reporters* Energie durch *fluorescence resonance energy transfer (FRET)* auf den *Quencher* übertragen und von diesem in Form von Wärme oder Licht mit hoher Wellenlänge emittiert. Da der Detektor des real time PCR Geräts zwischen der Wellenlänge des vom Reporter bzw. vom Quencher abgestrahlten Lichtes unterscheiden kann, wird kein Signal registriert. Die Effizienz des FRET ist zur vierten Potenz abhängig von der räumlichen Entfernung zwischen *Reporter* und *Quencher*. Nach der sequenzspezifischen Bindung der Sonde an die Ziel-DNS in der Annealing-Phase der PCR wird diese durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Dadurch werden *Reporter* und *Quencher* getrennt und ein Signal proportional zur Menge der amplifizierten Ziel- DNS generiert (Livak et al., 1995). Die Sonde selbst kann nicht als Primer fungieren, da ihr 3'-Ende durch ein ddNTP oder eine Phosphatgruppe blockiert ist.

Ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff (ROX) ist im PCR-Mastermix in Lösung enthalten. Das emittierte Signal ist unabhängig von der PCR und wird von der Auswertungssoftware zum Abgleich von kleineren Ungenauigkeiten beim Pipettieren der Reaktionsansätze verwendet (ROX-Normalisierung).

3.3.2.1. Reaktionsspektrum der TaqMan[®] Sonde PV-Taq01

Eine erste TaqMan[®] RT-PCR wurde mit den zuvor unter Verwendung von SYBR[®]Green getesteten Primern PV-03R und PV-02 und der Sonde PV-Taq01 durchgeführt. Um das Reaktionsspektrum der Sonde zu untersuchen, wurden 21 Pestivirusisolate eingesetzt: **BVDV-1 (a)** C86; **(b)** CP7, Osloss; **(c)** 519; **(d)** 287-7KH, 14658; **(e)** Deer-GB1; **(f)** 10558, 12482; **(g)** S10; **(h)** Leon-6; **BVDV-2 (a)** 890, 653; **(b)** Soldan, Gi-4; **BDV-1 (a)** X818; **BDV-2** V60 (Reindeer-1), 17385; **BDV-3** Gifhorn; **KSPV** Brescia; **Stamm Giraffe-1** (Abb. 7). Mit der TaqMan[®] Sonde PV-Taq01 ließen sich alle verwendeten BVDV-1 und BDV Isolate detektieren (Tab. 10., Abb. 7).

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität der beschriebenen TaqMan[®]PCR wurde Plasmid-DNS (pCR 2.1-BVDV) eingesetzt. Das Plasmid pCR2.1-BVDV enthält eine Pestivirusteilsequenz (5' NTR-E^{rms} Stamm 18602). 10⁶ bis 10¹ Kopien des Plasmids je Reaktion wurden in der TaqMan[®]PCR als Triplikate eingesetzt. Das Detektionslimit lag bei 100 Plasmid-DNS-Kopien pro Ansatz (Abb. 8a). Ausgehend von den Ct-Werten wurde eine Standardkurve erstellt (Abb. 8b), aus der sich die Effizienz der TaqMan[®]DNS wie folgt berechnen lässt:

$$m = -(\log E)^{-1} \quad E \text{ (Effizienz der PCR)}$$

$$E = 10^{(-1/m)}, \quad m \text{ (Steigung (Slope))}$$

$$E = 1.68$$

Die maximale Effizienz einer PCR liegt bei $E = 2$ (Verdopplung der Target-DNS je Zyklus).

In einem zweiten Versuch wurde die Sensitivität der TaqMan[®]RT-PCR mit ÜS aus infizierten Zellkulturen getestet. BVDV-1 NCP7 Virus wurde in der Zellkultur vermehrt und die Infektiosität (TCID₅₀/ml) im geernteten Überstand bestimmt. 4000 bis 0.4 TCID₅₀ je Reaktion wurden als Triplikate in der PCR eingesetzt. Vorversuche haben gezeigt, dass der Nachweis pestiviraler RNS aus Kulturüberstand infizierter Zellen direkt, also ohne Präparation von Nukleinsäuren, effizient möglich ist. Mit Hilfe der Sonde PV-Taq01 konnten in diesem Verfahren 4 TCID₅₀ in einem Ansatz nachgewiesen werden (Abb. 9).

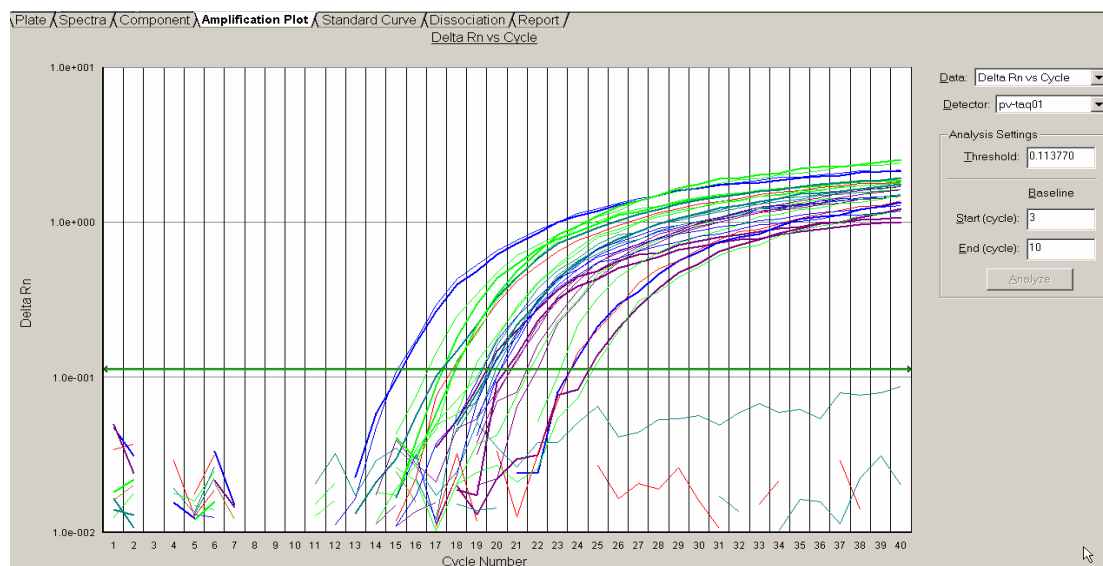


Abb.7: Reaktionsspektrum der Sonde PV-Taq01. 21 Pestivirusisolate wurden in der TaqMan[®]RT-PCR mit den Primern PV-03R und PV-02 sowie der Sonde PV-Taq01 getestet. Die Sonde erkannte 15 Pestivirusisolate (BVDV-1 und BDV s. Tab. 10). Die beiden Linien unterhalb der threshold-Ebene entsprechen den NTCs (non target controls, ohne RNS).

a

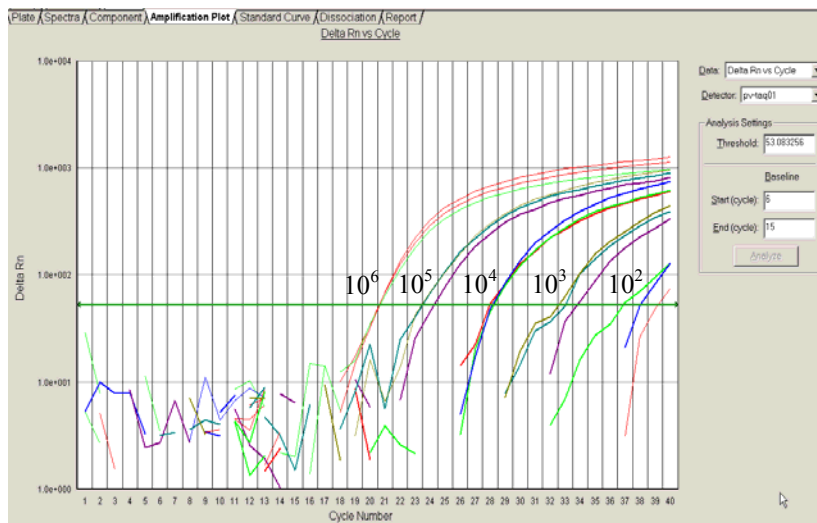
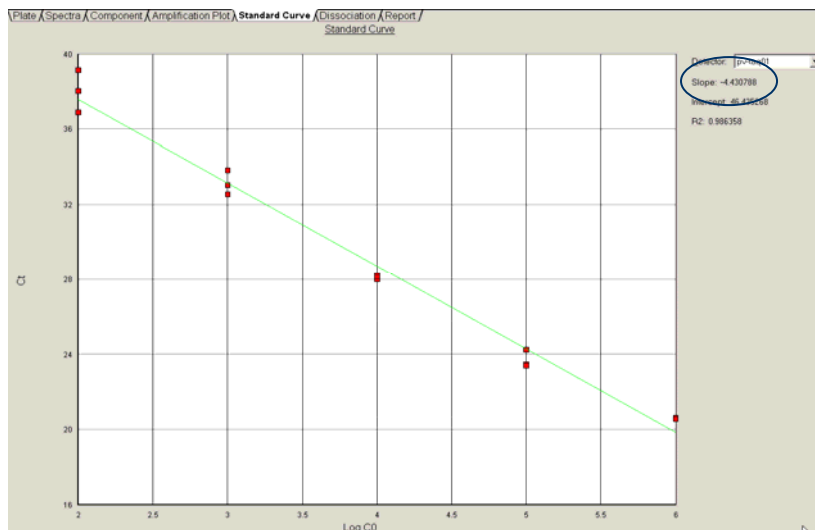


Abb. 8:
Sensitivität der TaqMan® PCR
a: das Plasmid pCR 2.1 - BVDV wurde als Standard (10^6 bis 10^1 Kopien pro Reaktion) in Triplikaten eingesetzt. 10^2 Kopien des Plasmids ließen sich mit der Sonde PV-Taq01 detektieren.
b: Standardkurve der TaqMan® PCR.
 $m = -(\log E)^{-1}$
 $E = 10^{(-1/m)}$
 $E = 1.68$
E (Effizienz der PCR)

b



m (Steigung (Slope))

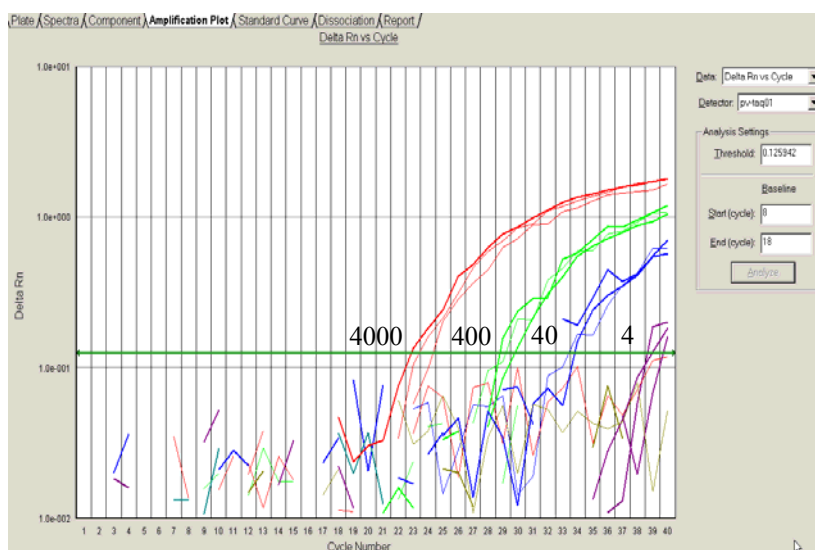


Abb. 9:
Sensitivität der TaqMan® RT-PCR
Verdünnungen von ÜS infizierter Zellkulturen (BVDV nzp CP7) 4000 – 0.4 TCID₅₀ wurden in Triplikaten eingesetzt. 4 TCID₅₀ wurden mit der Sonde PV-Taq01 detektiert.

3.3.2.2. Reaktionsspektrum der TaqMan[®] Sonde PV-Taq02

Die Sonde PV-Taq02 wurde in einer TaqMan[®] RT-PCR mit 23 Pestivirusisolaten getestet. Die folgenden Isolate wurden hierfür verwendet: **BVDV-1(a)** C86, 200085; **(b)** CP7; **(c)** 519; **(d)** 14658; **(e)** Deer-GB1; **(f)** 10558, 12482; **(e)** S10; **(h)** Leon-6; **BVDV-2** (a) 890, 659, ED, Gi-2; **(b)** Soldan, Gi-4; **BDV-1** (a) X818; **BDV-2** V60 (Reindeer-1) und AZ79; **BDV-3** Gifhorn; **KSPV** Brescia; **Stamm Giraffe-1** und **Stamm Hobi**. Die Sonde PV-Taq02 detektierte alle BVDV-2 und BDV Isolate, sowie die Isolate Giraffe-1, Hobi und Vertreter der Subgruppen BVDV-1a, c, d und h (Abb. 10, Tab.10). Das Reaktionsspektrum der Sonde PV-Taq02 ist in Tabelle 10 zusammengefasst.

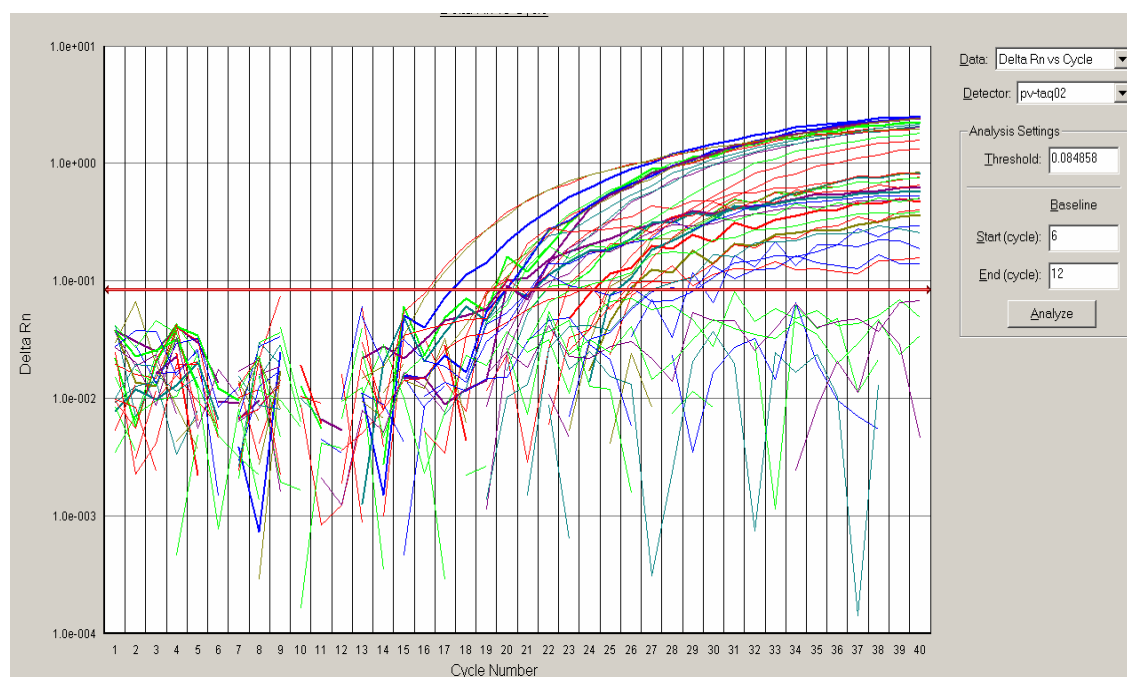


Abb. 10: Reaktionsspektrum der Sonde PV-Taq02. 23 Pestivirusisolat wurden in der TaqMan[®] RT-PCR mit den Primern PV-03R und PV-02 sowie der Sonde PV-Taq02 getestet. PV-Taq02 detektierte 17 Isolate (BVDV-2a, 2b; BVDV-1a, 1c, 1d, 1h; BDV-1, 2, 3; Giraffe-1; Hobi).

3.3.3. Multiplex TaqMan® RT-PCR

Die Sonden PV-Taq01 und PV-Taq02 wurden so ausgewählt, dass eine simultane Verwendung im Rahmen einer Multiplex PCR möglich ist. Dabei konnten alle ruminanten Pestiviren einschließlich der Isolate Giraffe-1 und Hobi nachgewiesen werden (Tab. 10). Die Kombination beider Sonden ermöglicht die Differenzierung von Pestivirusisolaten aus Rindern. Alle getesteten BVDV-2 Stämme wurden von der Sonde PV-Taq02 erkannt, nicht jedoch von der Sonde PV-Taq01 (Abb. 11a, b, c). Im Gegenzug wurden alle getesteten BVDV-1 Isolate durch die Sonde PV-Taq01 detektiert. Eine Überlappung des Reaktionsspektrums der Sonden trat bei Vertretern der BVDV-1 Subtypen a und d auf (Abb. 11a).

a

Spezies, Subgruppe	Isolat	Sonden PV-Taq01/ PV-Taq02
BVDV-2a	890	-/+
	659	-/+
	ED	-/+
	Gi-2	-/+
BVDV-2b	Gi-4	-/+
	Soldan	-/+
BVDV-1a	C86	+/+
BVDV-1b	CP7	+/-
BVDV-1d	14658	+/+
BVDV-1f	10558	+/-

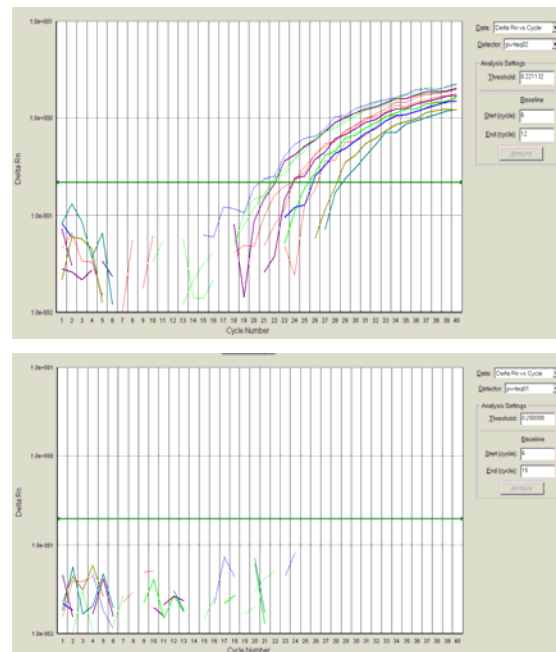


Abb. 11: Multiplex TaqMan® RT-PCR . a: Getestete Isolate und Reaktionsspektrum der Sonden PV-Taq01 und PV-Taq02 in der Multiplex TaqMan® RT-PCR. b: Reaktion von BVDV-2 Isolaten mit der Sonde PV-Taq02. c: Reaktion von BVDV-2 Isolaten mit Sonde PV-Taq01.

3.4. Untersuchung der genetischen Heterogenität ruminanter Pestiviren

Ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung von Pestiviren ist ihre genetische Verwandtschaft, die sich anhand phylogenetischer Analysen ermitteln lässt. Solche Analysen können auf Basis der kompletten Nukleinsäuresequenzen (gesamtes Virusgenom) oder unter der Verwendung von Teilsequenzen erstellt werden. Die Bestimmung kompletter Virusgenome ist mit erheblichem Aufwand und Kosten verbunden, daher basieren phylogenetische Analysen meist auf dem Vergleich von Teilsequenzen. Hierzu wurden häufig kleine Sequenzabschnitte aus der 5' NTR (weniger als 250 Nukleotide) verwendet, die sich einfach und schnell erstellen lassen (Baule et al., 1997; Beer et al., 2002; Flores et al., 2002; Jones et al., 2001; Luzzago et al., 2001; Nagai et al., 2001; Paton et al., 1995; Ridpath et al., 2000; Vilcek et al., 1994; Vilcek et al., 1997). Allerdings ist dieser Genombereich für eine statistisch signifikante Einteilung von Pestiviren in Subgruppen nur eingeschränkt geeignet (Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b). Einerseits repräsentiert der vorgenannte Sequenzabschnitt nur ca. 2% des gesamten Genoms, andererseits weisen die Genomsequenzen verschiedener Pestivirusisolate in diesem Bereich unterschiedliche Längen auf, so dass eine vergleichende Analyse erheblich erschwert wird (Avalos-Ramirez, 2002). Für die statistisch signifikante genetische Unterteilung von Pestiviren in Spezies und Subgruppen sind größere Abschnitte aus dem kodierenden Bereich des Genoms besser geeignet. So wurde durch Analysen auf der Grundlage kompletter Sequenzen sowie einzelner Gene, nämlich des N^{pro}-Gens und des E2-Gens, eine statistisch signifikante Unterteilung von Pestiviren in Subgruppen innerhalb der Virusspezies erreicht (Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b).

Die phylogenetischen Analysen in dieser Arbeit wurden auf der Basis kompletter Sequenzen des N^{pro}-Gens und des E2-Gens durchgeführt.

3.4.1. Auswahl von Pestivirusisolaten für die phylogenetische Untersuchung

Von den 293 mittels RT-PCR untersuchten Pestivirusisolaten wurden 37 für die Ermittlung der N^{pro}-Gen-Sequenz ausgewählt; die Herkunft und das Jahr der Isolierung sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

21 der ausgewählten Virusisolate stammen aus deutschen Rinderbeständen (**BVDV-2** Isolate 3709, 2230, 659, 653, 12524, 18605, und **BVDV-1** Isolate 12482, 11468, 10558, 22531, 18602, Paplitz, 287-7KH, 387KH, 5785, 5273, 14652, 14657, 14658, 14816, 19371). Die phylogenetische Gruppierung dieser Isolate sollte einerseits zur Bestätigung der Ergebnisse der RT-PCR dienen und andererseits einen Überblick über die Verbreitung von Pestivirussubtypen innerhalb der deutschen Rinderpopulation liefern.

Des Weiteren wurden Pestivirusisolate aus Beständen charakterisiert, die in ein Bekämpfungsprogramm/Impfprogramm eingebunden waren. Die Untersuchung solcher Virusisolate kann wichtige Hinweise auf die Wirksamkeit der eingesetzten Impfstoffe liefern. In diesem Zusammenhang wurden Isolate aus Deutschland (5785, 14652, 14657, 14658, 14816, 19371, 18602, 18605), Frankreich (Isolate 22424, 4478) und dem Vereinigten Königreich (Isolate C79, 221, 200085, 700097) untersucht. Alle vorgenannten Isolate stammten aus Beständen, in denen seit längerem Impfungen gegen BVD/MD durchgeführt wurden.

Neben den bisher erwähnten Virusisolaten wurden einige Pestiviren mit Besonderheiten hinsichtlich ihres Ursprungs für die Sequenzierung herangezogen. Der nzp Stamm Soldan wurde aus einem Rind mit MD-ähnlichen Symptomen 1992 in Eldorado do Sul, Brasilien isoliert. Durch Sequenzierung des 5' NTR-Genombereichs ließ sich Soldan als BVDV-2 klassifizieren (Canal et al., 1998).

Der Stamm AZ79 stammt von einem Lamm mit Symptomen des "hairy shaker" Syndroms aus einem Schafbestand in Sachsen. Durch Sequenzierung der 5' NTR konnte eine 98%ige Ähnlichkeit zu Reindeer-1 auf Nukleotidebene nachgewiesen werden (Schaarschmidt et al., 2000). Im Jahr 2000 wurde ein weiteres Pestivirus (17385) bei einem Lamm aus einer Schafherde in Hessen isoliert. Beide aus Schafen gewonnenen Pestiviren ließen sich mittels RT-PCR nicht den Spezies BVDV-1 oder BVDV-2 zuordnen (s.o.)

Weiterhin wurde ein, durch RT-PCR als BVDV-1 klassifiziertes Isolat aus einer Antilope sequenziert.

Pestivirus-Kontaminationen von Zellkulturen und biologischen Produkten wie Vakzinen oder Interferon sind meist Folge der Verwendung von kontaminiertem Rinderserum. Zur

Detektion von Pestiviruskontaminationen wurde in den vergangenen Jahren verstärkt die RT-PCR eingesetzt (Audet et al., 2000; Bolin et al., 1994; Giangaspero et al., 2001; Harasawa, 1995; Sasaki et al., 1996; Studer et al., 2002; Vilcek, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Virusisolate aus kontaminierten Rinderseren (Isolate S14 (Ursprungsland Frankreich) und S10 (Ursprung Südamerika) und Isolate aus pestiviruskontaminierten Zellkulturen (Isolate ED aus *Equine Dermis* (ED) Zellen und K7-00 aus MDBK Zellen)) bearbeitet. Das ebenfalls untersuchte Isolat "Hobi" (FBS-Kontamination, Ursprung vermutlich Südamerika), wurde 2001 erstmals beschrieben (Schirrmeier et al., 2002) und durch phylogenetische Analysen auf Basis der 5' NTR als eine mögliche neue Pestivirusspezies eingestuft.

3.4.2. Ermittlung von Nukleinsäuresequenzen (N^{pro} und E2) ausgewählter Pestivirusisolate

Zur Amplifikation der für das N^{pro}-Gen codierenden Sequenzen wurden die pan-Pestivirus Primer OI 100 (Becher et al., 1998) und OI 1400R (Becher et al., 1997) verwendet. Das ca. 1.33 kB große Amplifikationsprodukt umfasst einen Teil der 5' NTR, die kompletten N^{pro}- und Kapsidprotein-Gene sowie einen Teil der E^{ms}-Gen Sequenz (Abb. 12a).

Die für das E2 kodierende Sequenz wurde für die Stämme 17385, AZ79, S10 und 11468 bestimmt. Aufgrund der Sequenzvariabilität der untersuchten Pestiviren im Bereich des E2 mussten verschiedene Primer-Kombinationen und Amplifikationsbedingungen für die RT-PCR verwendet werden (s. Material und Methoden). Die Größe der Amplifikationsprodukte lag zwischen 2.26 kB (Isolat 17385) und ca. 1.4 kB (Isolate AZ79, 11468 und S10).

Die resultierenden Amplifikationsprodukte wurden in bakterielle Plasmidvektoren kloniert (Abb. 13), die Nukleinsäuresequenzen dreier unabhängiger Klone für jeweils beide DNS-Stränge bestimmt und eine Konsensussequenz ermittelt.

Während alle ermittelten N^{pro}-Gen Sequenzen eine Länge von 504 Nukleotiden aufwiesen, zeigten die E2-Gen Sequenzen unterschiedliche Längen. Die Genbank-Zugangsnummern der ermittelten Sequenzen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

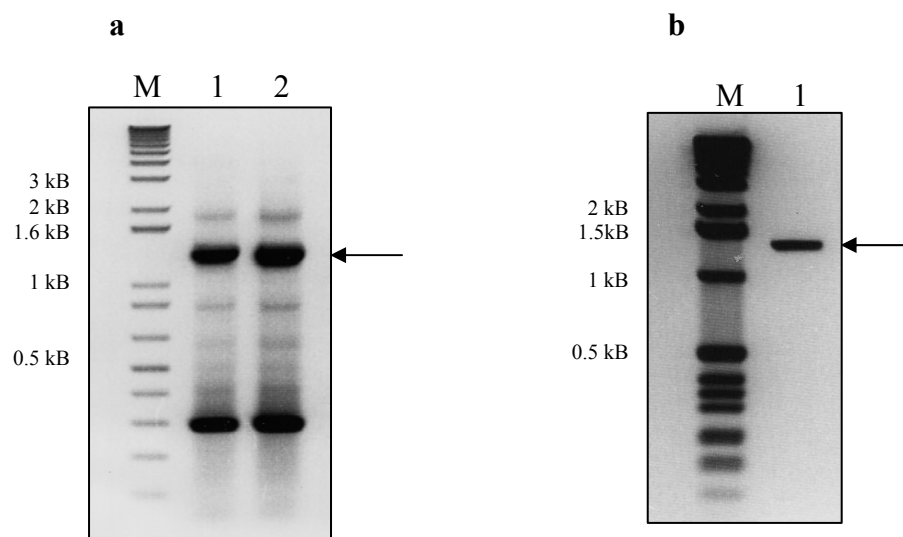


Abb. 12: Amplifikation der N^{pro}-Gen Sequenz. a: Unter Verwendung der Primer OI 1400R und OI 100 wurde ein Amplifikat von ca. 1.33 kDa gewonnen, das einen Teil der 5'NTR, das N^{pro}-Gen, das Kapsidprotein-Gen und einen Teil der E^{ms}-Gen Sequenz umfasst. **M.** Marker, **Spur 1.** Isolat 18602, **Spur 2.** Isolat 18605. **b: Gereinigte DNS, die zur Bestimmung der Nukleinsäuresequenz verwendet wurde.** **M.** Marker, **Spur 1.** Gereinigte DNS (ca. 1.33 kDa) Stamm Hobi. Die Pfeile weisen auf Amplifikate in der erwarteten Größe hin.

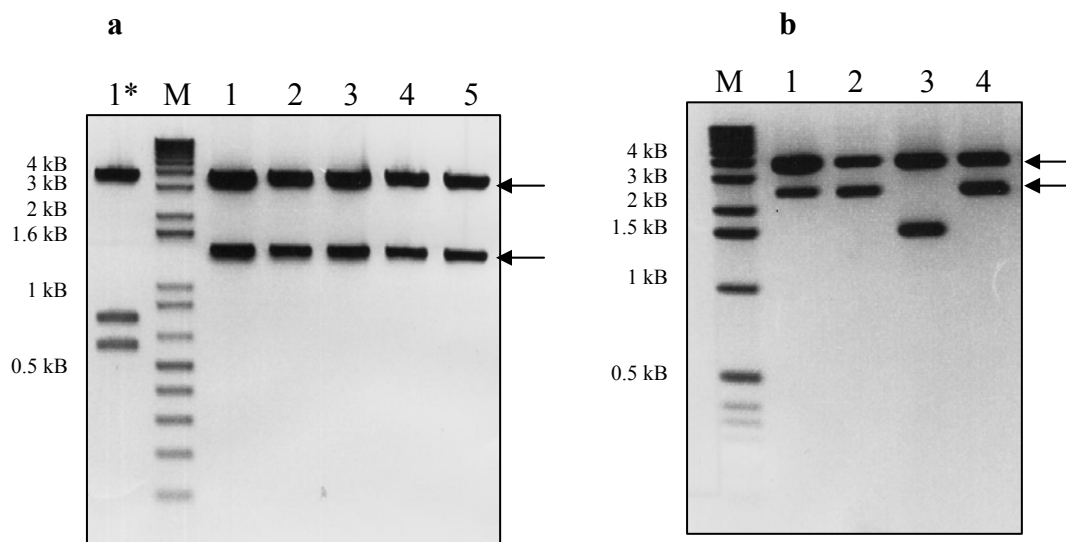


Abb. 13: Enzymverdau von Plasmid-Präparationen. Nach der Klonierung eines PCR-Fragmentes in den Plasmid-Vektor pCR 2.1 wurde Plasmid-DNS von mindestens 6 Klonen präpariert und mit Restriktionsenzymen verdaut. **a: Enzymverdau einer Plasmid-Präparation (Isolat S14).** **M.** Marker **Spur 1*:** S14-Klon 1, Verdau mit EcoRI; **Spuren 1-5.** S14-Klone 1 bis 5, Verdau mit BamHI/EcoRV. Pfeile von oben nach unten zeigen das Plasmid pCR 2.1 (3.9 kDa) und das klonierte Fragment (1.33 kDa; 5' NTR-E^{ms}). **b: Enzymverdau einer Plasmid-Präparation (Isolat 17385).** Verdau mit den Enzymen EcoRV und BamHI. **M.** Marker; **Spuren 1, 2 und 4:** erwartete Größe des Fragments ca. 2.2 kDa; E2. **Spur 3.** nicht korrektes Fragment. Pfeile zeigen von unten nach oben die klonierten Fragmente bzw. das Plasmid pCR 2.1.

Virusisolate	Abkürzung	Jahr der Isolierung	Spezies Herkunft	Land Herkunft	GenBank-Zugangsnummer N^{pro} E2
12524/98	12524	1998	Rind	Deutschland	AY735460
3709/99	3709	1999	Rind	Deutschland	AY735474
10558/99	10558	1999	Rind	Deutschland	AY735457
11468/99	11468	1999	Rind	Deutschland	AY735458 AY734488
12482/99	12482	1999	Rind	Deutschland	AY735459
653/00	653	2000	Rind	Deutschland	AY735479
659/00	659	2000	Rind	Deutschland	AY735480
2230/00	2230	2000	Rind	Deutschland	AY735470
17385 /00	17385	2000	Schaf	Deutschland	AY163651 AY163658
18602/00	18602	2000	Rind	Deutschland	AY735465
18605/00	18605	2000	Rind	Deutschland	AY735466
22531/00	22531	2000	Rind	Deutschland	AY735472
22755/00	Antilope-G1	2000	Antilope	Deutschland	AY735482
K7-00	K7-00	2000	Zellkultur- kontamination	Deutschland	AY735487
S10/00	S10	2000	Serumkontamination (Rind)	Argentinien	AY735489 AY734489
S14-1/00	S14-1	2000	Serumkontamination (Rind)	Frankreich	AY735490
S14-2/00	S14-2	2000	Serumkontamination (Rind)	Frankreich	AY735491
Chemnitz AZ79	AZ79	1999	Schaf	Deutschland	AY163651 AY163659
5785/01	5785	2001	Rind	Deutschland	AY735478
VDPaplit/01	Paplit	2001	Rind	Deutschland	AY735488
287-7KH/01	287-7KH	2001	Rind	Deutschland	AY735473
387KH/01	387KH	2001	Rind	Deutschland	AY735475
Soldan	Soldan	1992	Rind	Brasilien	AY735495
5273/02	5273	2002	Rind	Deutschland	AY735477
14652/02	14652	2002	Rind	Deutschland	AY745461
14657/02	14657	2002	Rind	Deutschland	AY735462
14658/02	14658	2002	Rind	Deutschland	AY735463
14816/02	14816	2002	Rind	Deutschland	AY735464
19371/02	19371	2002	Rind	Deutschland	AY735467
4478/02	4478	2002	Rind	Frankreich	AY735476
22424/02	22424	2002	Rind	Frankreich	AY735471
C79	C79	2002	Rind	England	AY735484
221	221	2002	Rind	England	AY735469
200085	200085	2002	Rind	England	AY735468
700097	700097	2002	Rind	England	AY735481
Hobi	Hobi	2000	Serumkontamination (Rind)	Südamerika	AY735486
ED-Pestivirus	ED	2002	Zellkultur- kontamination	Deutschland	AY735485

Tabelle 11. Tabellarische Auflistung der sequenzierten Pestivirusisolate.

3.4.3. Phylogenetische Analysen auf der Basis von N^{pro}-Gen Sequenzen

Die ermittelten N^{pro}-Gen Sequenzen (s. Tabelle 11) sowie publizierte Sequenzen aus der Genbank (s. Material und Methoden) wurden für phylogenetische Analysen eingesetzt. Hierzu wurden die Nukleinsäuresequenzen paarweise miteinander verglichen und der Grad der Divergenz (genetische Distanz) berechnet (Kimura, 1980). Auf Basis der genetischen Distanzen wurde ein phylogenetischer Baum erstellt und durch eine Bootstrap-Analyse mit 1000 replikativen Datensätzen statistisch abgesichert (Abb. 14).

Die genetischen Distanzen zwischen den untersuchten Vertretern der etablierten Pestivirusspezies BVDV-1, BVDV-2, BDV (BDV-1), KSPV und der "tentativen" Spezies Giraffe-1 lagen zwischen 35.27 und 57.88. Die beiden als Vertreter möglicher neuer Pestivirusspezies klassifizierten Isolate Hobi und Pronghorn-Antelope zeigten gegenüber den sonstigen analysierten Pestiviren genetische Distanzen von 43.34 bis 50.33 bzw. 53.19 und 65.61.

Zwischen den untersuchten Isolaten aus Subgruppen innerhalb der etablierten Pestivirusspezies wurden die folgenden genetischen Distanzen berechnet:

KSPVa und b	16.23 bis 18.39
BVDV-1a bis "e"	16.16 bis 31.38
BVDV-2a bis c	16.43 bis 24.34
BDV-1a und b	25.41 bis 27.31
BDV-1 bis 3 ¹	28.87 bis 37.57.

Die Divergenz zwischen den untersuchten Isolaten innerhalb der vorgenannten Subgruppen lag zwischen 0.20 und 19.91.

Der phylogenetische Baum weist genetische Hauptgruppen auf, die den bekannten Pestivirusspezies BVDV-1, BVDV-2, BDV und KSPV entsprechen. Weitere Hauptgruppen umfassen die "tentative" Spezies Giraffe und die nicht klassifizierten Isolate Hobi und Pronghorn-Antelope (Vilček et al., 2001. Nicht veröffentlicht; GenBank Zugangsnummer AF410791) (Abb. 14).

¹ Der Status von BDV-2 und BDV-3 als Subgruppen von BDV oder eigene Spezies ist nicht endgültig geklärt.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten ruminanten Pestivirusisolate ließen sich den Spezies BVDV-1 und BVDV-2 und BDV-2 zuordnen (Abb. 14).

Neben den vorgenannten Hauptgruppen lassen sich zahlreiche genetische Subgruppen unter Berücksichtigung der genetischen Distanzen sowie der Topologie des phylogenetischen Baums unterscheiden. BVDV-1 Isolate weisen eine erhebliche Heterogenität auf und können nach Beschreibung von Vilcek in bis zu 11 Subgruppen unterteilt werden (Vilcek et al., 2001). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzuntersuchungen auf der Basis des gesamten N^{pro}-Gens führten bei BVDV-1 zu einer Unterteilung in 10 Subgruppen (Abb. 14). Die genetischen Distanzen zwischen Vertretern der Subgruppen g und h lagen im Grenzbereich zwischen Isolat (von 0.20 bis 17.49) und Subgruppe (von 16.74 bis 19.48).

Von uns untersuchte BVDV-1 Isolate aus Deutschland ließen sich fünf verschiedenen Subgruppen zuordnen (1a (n=1), 1b (n=8), 1c (n=1), 1d (n=8) und 1f (n=2)). Besonders häufig vertreten war die Subgruppe 1b, gefolgt von 1d. Eine ähnliche Verteilung wurde von Tajima für BVDV-1 Isolate aus Niedersachsen beobachtet (Tajima et al., 2001) (Abb. 14). Vier weitere Isolate aus Großbritannien (C79, 200085, 700097, 221) wurden als BVDV-1a, zwei Virusisolate aus Frankreich (22424, 4478) als BVDV-1b eingestuft. Aus einem foetalen Rinderserum mit Herkunftsangabe Frankreich konnten zwei Pestiviren (S14-1 und S14-2) isoliert werden, die sich u.a. im Hinblick auf das Vorhandensein einer EcoRI Schnittstelle in den Amplifikationsprodukten der Primer OI 100 und OI 1400R unterschieden (Abb. 13a, Spur 1*). Anhand der vergleichenden Sequenzanalyse auf der Basis des N^{pro}-Gens konnte S14-2 als BVDV-1b charakterisiert werden. Für das Isolat S14-1 ergab sich eine Zugehörigkeit zur Subgruppe BVDV-1"e" zusammen mit weiteren in Frankreich isolierten Pestiviren (u.a. 26-F). Das Virusisolat S10 zeigte eine gewisse Ähnlichkeit (Homologie 93.2%) zu dem von Vilcek als BVDV-1"e" klassifizierten Virusisolat 3-It (Vilcek et al., 2001) (Abb. 14).

BVDV-2 weist gegenwärtig 3 Subgruppen (a, b und c) auf. Alle bisher in Deutschland isolierten Mitglieder der Spezies BVDV-2 gehören zur Subgruppe a und sind eng miteinander verwandt (Abb. 14).

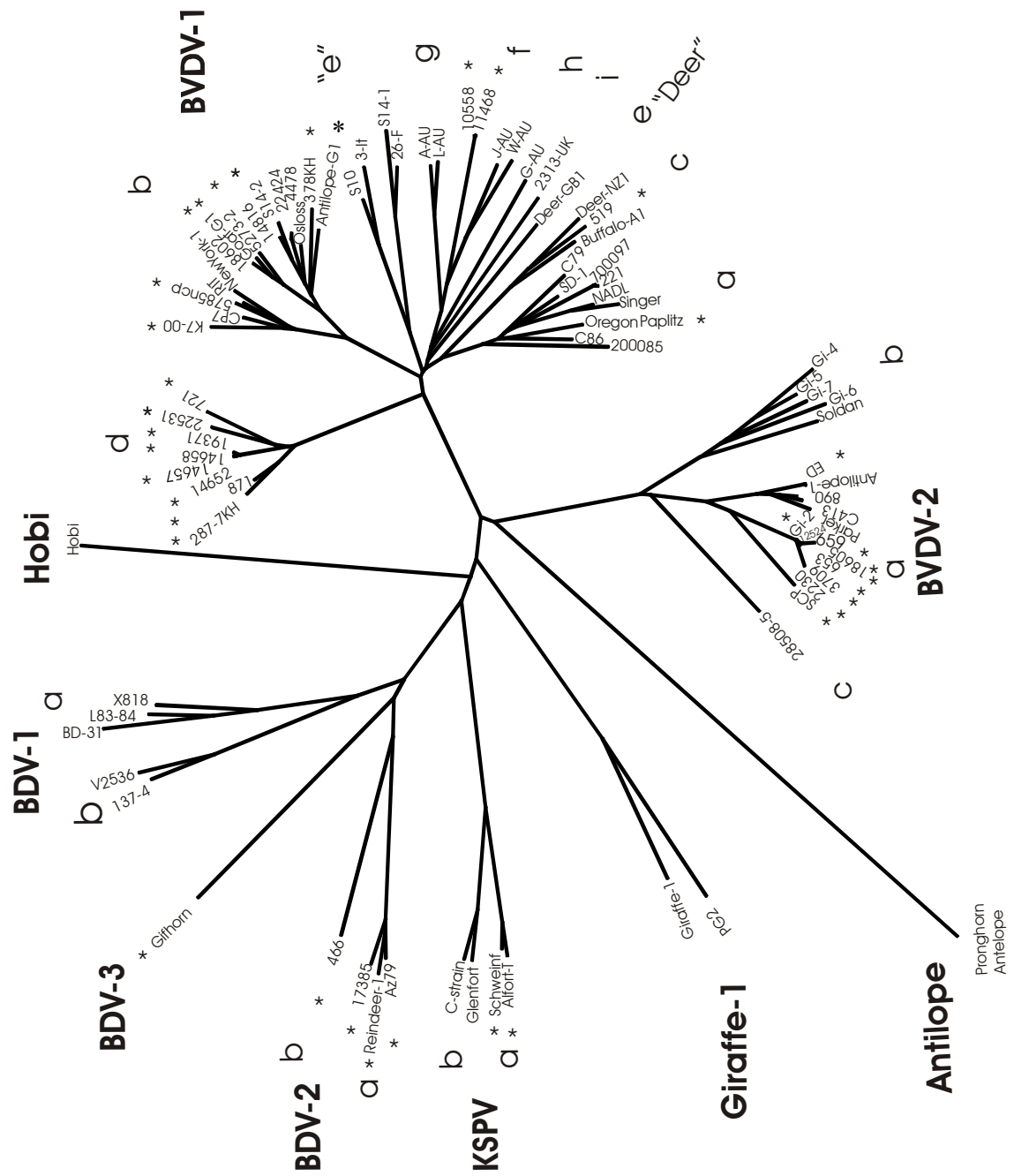
Zwei Isolate aus Schafen waren in der RT-PCR durch ein besonderes Reaktionsmuster aufgefallen. Die phylogenetische Analyse zeigte, dass beide Viren mit den Isolaten

Reindeer-1 und Bison-1 aus dem Zoo Duisburg eng verwandt sind. Der resultierende genetische Cluster kann als BDV-2 bezeichnet werden, die klassischen BDV-Isolate demgemäß als BDV-1. Ob BDV-1 und BDV-2 als Subgruppen oder eigenständige Pestiviruspezies eingeordnet werden, ist noch nicht entschieden. Das Isolat Gifhorn bildet eine weitere Gruppe, die von Becher et al. als BDV-3 klassifiziert wurde (Becher et al., 2003) (Abb. 14).

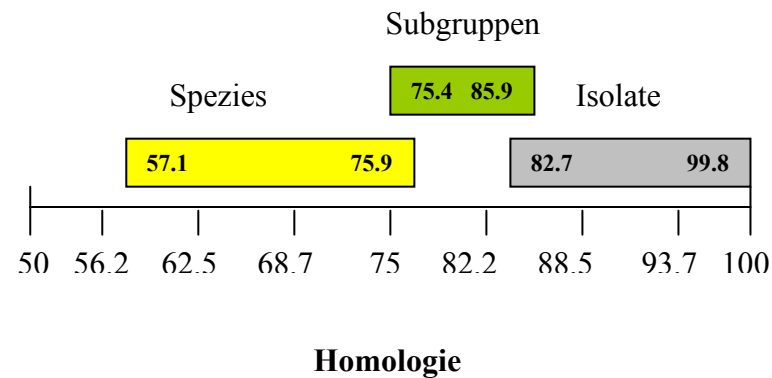
Bei dem Isolat Hobi handelt es sich vermutlich um ein Virus aus kontaminiertem Rinderserum südamerikanischer Herkunft, das anhand einer phylogenetischen Analyse auf Basis der 5' NTR als eine mögliche weitere Spezies vorgeschlagen wurde (Schirrmeier, 2002). Die phylogenetische Analyse von Hobi auf Basis der N^{pro} kodierenden Nukleinsäuresequenz unterstützt diese Eingruppierung. Die Divergenz zwischen Hobi und anderen Pestivirusisolaten liegt zwischen 43.34 und 50.33.

Die Nukleinsäuresequenz des Isolates "Pronghorn-Antelope" wurde von Vilcek und Ridpath in der GenBank deponiert (Vilcek et al., nicht veröffentlicht; GenBank-Zugangsnummer AF410791). Die phylogenetische Analyse der N^{pro}-Gen Sequenz weist das Isolat als wahrscheinliche weitere Pestiviruspezies aus. Die Divergenz zwischen Pronghorn-Antelope und anderen Pestivirusisolaten reicht von 53.19 bis 65.61.

Die Eingruppierung von Giraffe-1 und KSPV Isolaten ist identisch zur Klassifizierung, die von Becher et al. vorgeschlagen wurde (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 1999; Becher et al., 2003).



b



c

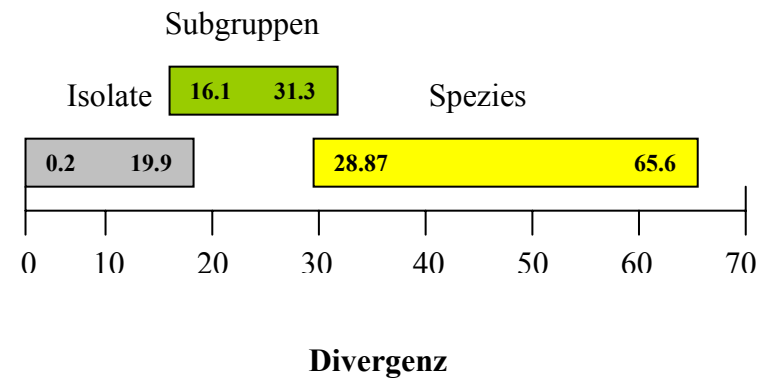


Abb. 14. Phylogenetischer Stammbaum von Pestiviren (N^{pro}-Gen). **a.** Der phylogenetische Baum wurde auf der Basis der kompletten Sequenz des N^{pro}-Gens erstellt. Die Sequenzen, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Alle anderen Sequenzen wurden von der Genbank bezogen (GenBank Zugangsnummern der Sequenzen s. Material und Methoden). Nach Berechnung der paarweisen genetischen Distanzen (Kimura, 1980) wurde mit Hilfe der Neighbour-Joining Methode ein phylogenetischer Baum erstellt (Felsenstein, 1993). Eine Bootstrap-Analyse mit 1000 Replikaten wurde zur statistischen Absicherung der Gruppierungen durchgeführt (Felsenstein, 1985). Die Astlängen sind proportional zu den genetischen Distanzen. Eingruppierung von BDV und BVDV-1 (a-e) nach Becher (Becher et al., 2003; Becher et al., 1999b), BVDV-1 "e"-f und "Deer" nach Vilcek (Vilcek et al., 2001). *Isolate aus Deutschland. **b.** Die Homologie der Isolate wurde mit Hilfe des Programms "Homologies" aus der GCG-Software (Autor Jack A.M. Leunissen) kalkuliert. **c.** Die Divergenz für die Spezies, Subgruppen und Isolate wurde mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode in dieser Arbeit berechnet.

3.4.4. Phylogenetische Analysen auf der Basis von E2-Gen Sequenzen

Das Glykoprotein E2 von Pestiviren induziert nach einer Infektion neutralisierende Antikörper durch das Immunsystem des betroffenen Tieres. Als immunogenes Protein unterliegt das E2 in besonderem Masse einem evolutionären Druck. Untersuchungen zur Heterogenität des E2 sind daher von besonderem Interesse. Phylogenetische Analysen auf Basis der ermittelten E2-Gen Sequenzen ausgewählter Virusisolate sowie publizierter Sequenzen (s.o.) wurden wie bereits für das N^{pro} beschrieben ausgeführt. Die Nukleinsäuresequenzen wurden paarweise miteinander verglichen und der Grad der Divergenz (genetische Distanz) berechnet (Kimura, 1980). Auf Basis der genetischen Distanzen wurde ein phylogenetischer Baum erstellt und durch eine Bootstrap-Analyse mit 1000 replikativen Datensätzen statistisch abgesichert (Abb. 15).

Die Divergenzen der E2-Gen Sequenzen zwischen den untersuchten Vertretern der etablierten Pestivirusspezies KSPV, BDV, BVDV-1 und, BVDV-2 sowie dem Isolat Giraffe-1 liegen zwischen 43.74 und 69.67.

Zwischen den untersuchten Isolaten aus Subgruppen innerhalb der etablierten Pestivirusspezies wurden die folgenden genetischen Distanzen berechnet:

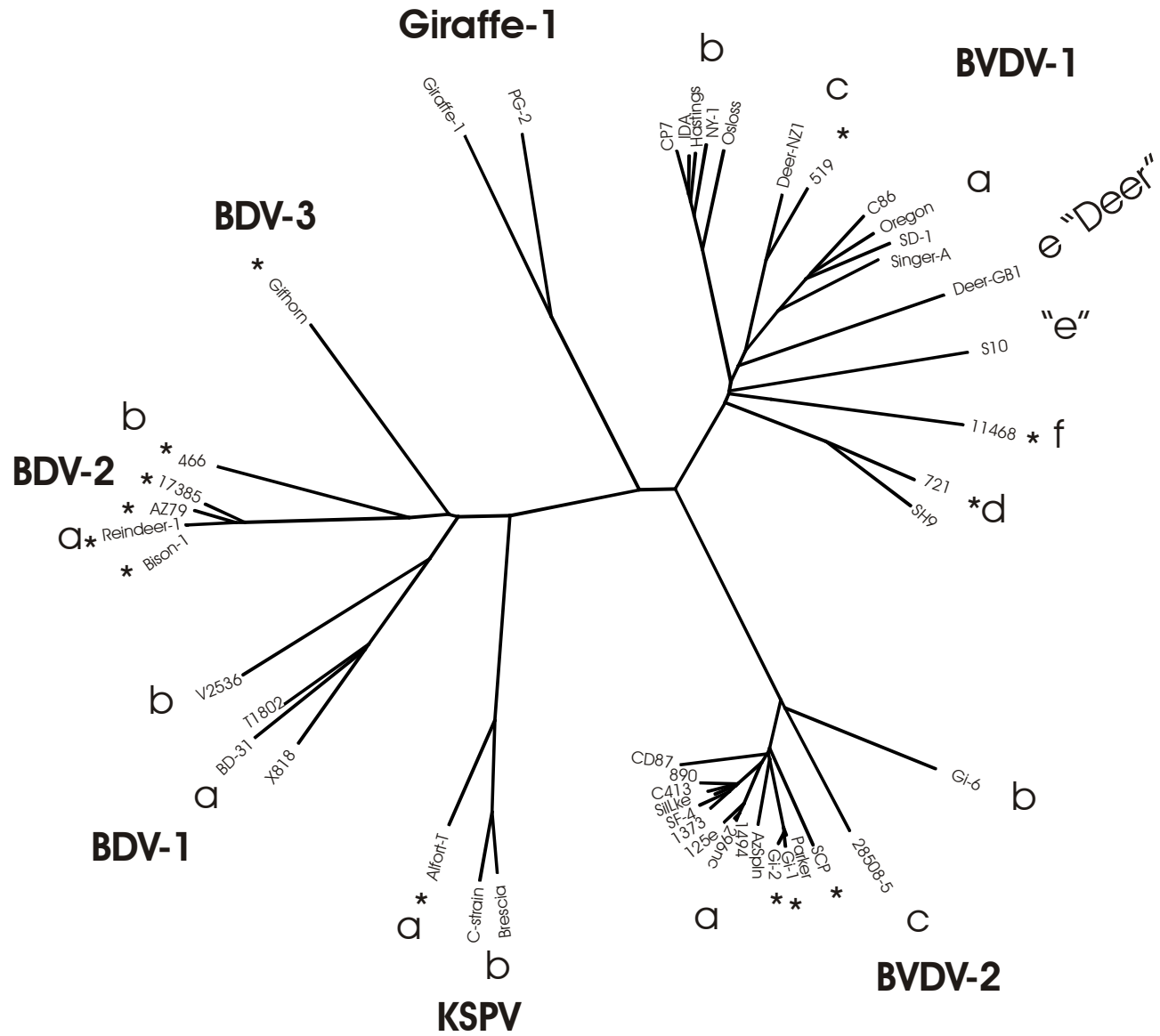
KSPV a und b:	18.72 bis 19.53
BVDV-1a bis f	22.22 bis 36.68
BVDV-2a bis c	18.90 bis 23.83
BDV-1a und b	28.90 bis 33.91
BDV-1 bis 3 ²	33.38 bis 42.30.

Die Divergenzen untersuchter Isolate innerhalb der genetischen Subgruppen liegen zwischen 0.18 bis 19.09.

Die Analysen auf Basis der E2-Gen Sequenzen und der N^{pro}-Gen Sequenzen ergaben eine weitgehend identische Topologie der phylogenetischen Bäume (Abb. 14 und 15). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu ermittelten E2-Gen Sequenzen ruminanter Pestiviren ließen sich Subgruppen innerhalb der Spezies BVDV-1 und BDV-2 zuordnen (Abb. 15).

² Der Status von BDV-2 und BDV-3 als Subgruppen von BDV oder eigene Spezies ist nicht endgültig geklärt.

a



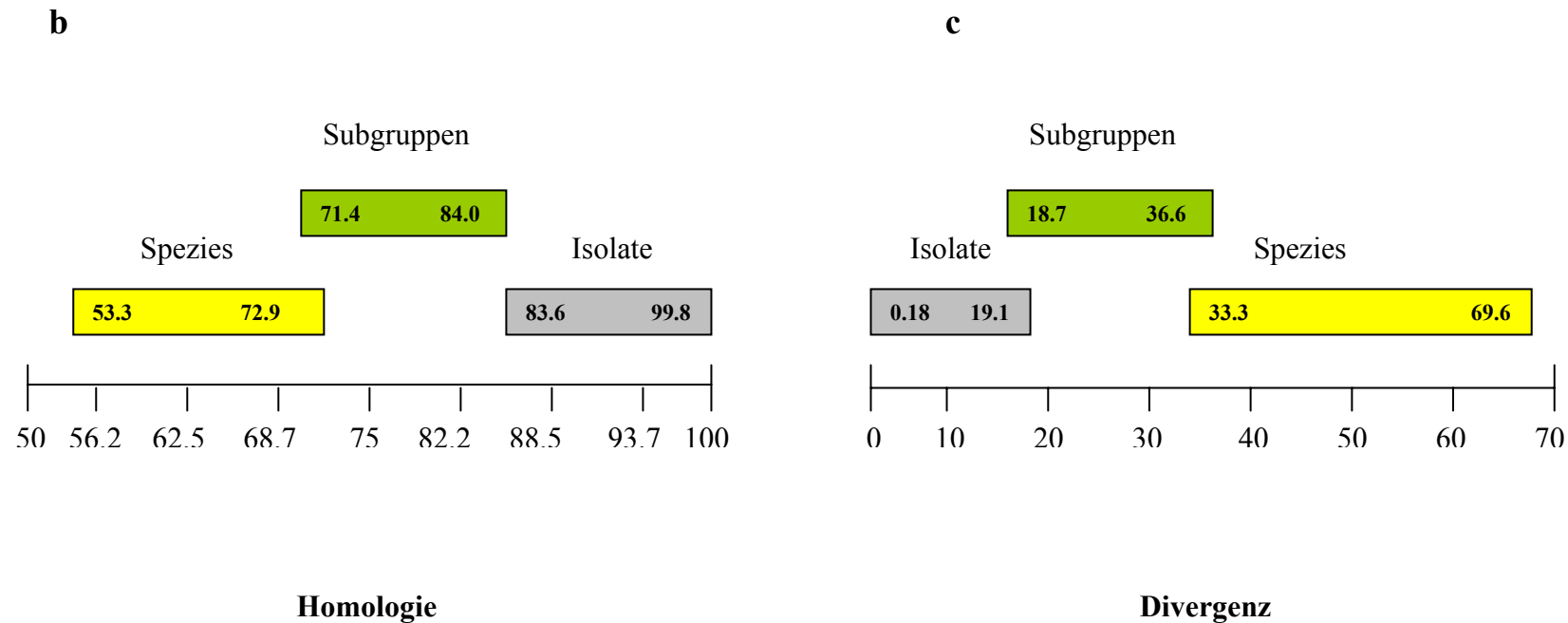


Abb.15. Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der genetischen Divergenz im E2-Gen. a. Der phylogenetische Baum wurde basierend auf kompletten Sequenzen des E2-Gens erstellt. Die Sequenzen, die in dieser Arbeit bestimmt wurden, sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Alle anderen Sequenzen wurden von der Genbank bezogen (GenBank Zugangsnummern der Sequenzen s. Material und Methoden). Nach Berechnung der paarweisen genetischen Distanzen (Kimura, 1980) wurde mittels der Neighbour-Joining Methode ein phylogenetischer Baum erstellt (Felsenstein, 1993). Eine Bootstrap-Analyse mit 1000 Replikaten wurde zur statistischen Absicherung der Gruppierungen durchgeführt (Felsenstein, 1985). Die Astlängen sind proportional zu den genetischen Distanzen. Eingruppierung von BDV und BVDV-1 (a-e) nach Becher (Becher et al., 2003; Becher et al., 1999b), BVDV-1 "e"-f und "Deer" nach Vilcek (Vilcek et al., 2001). *Isolate aus Deutschland. **b.** Die Homologie wurde mit Hilfe des Programms "Homologies" aus der GCG-Software berechnet. **c.** Die Divergenz für die Spezies, Subgruppen und Isolate wurde mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet.

3.4.5. Häufigkeitsverteilung der Divergenzen im N^{pro}-Gen

Die Divergenzen von 172 N^{pro}-Gen Sequenzen wurden mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet. Die erhaltenen Werte wurden in Klassen eingeteilt, eine Häufigkeitsverteilung ermittelt und in graphischer Form dargestellt (Programm Excel, Fa. Microsoft). Das Verteilungsmuster der Divergenzhäufigkeiten zeigt drei separate Maxima, die den genetischen Clustern Isolate, Subgruppen und Spezies (Genogruppen) entsprechen (Abb. 16).

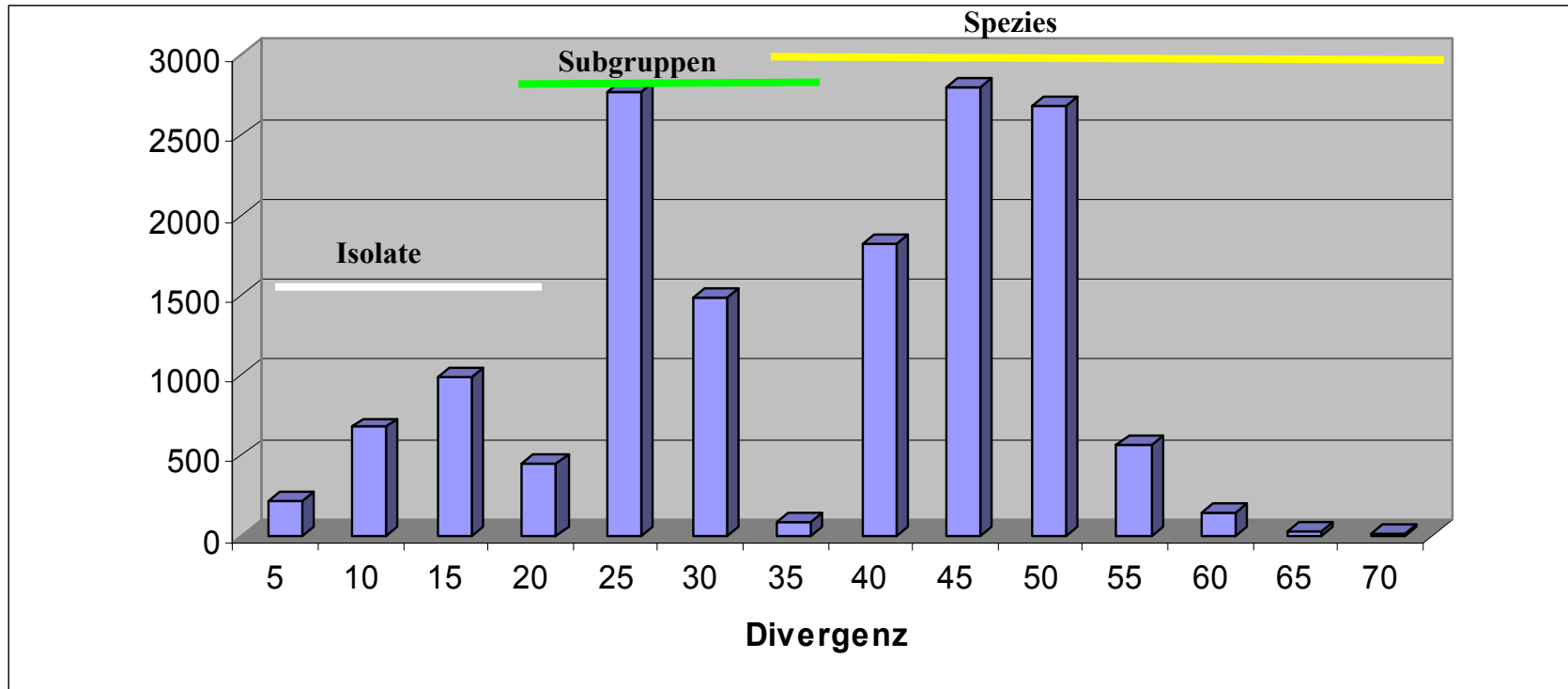


Abb. 16: Häufigkeitsverteilung der Divergenzen von 172 N^{pro}-Gen Sequenzen. Die genetischen Divergenzen von 172 Pestivirusisolaten auf Basis der N^{pro}-Gen Sequenz wurde mit Hilfe der Kimura-2-Parameter Methode berechnet und die Häufigkeitsverteilung graphisch dargestellt. Klasseneinteilung 0.2 bis 65.5. Die den genetischen Clustern Isolate, Subgruppen und Spezies (Genogruppen) entsprechenden Maxima sind graphisch hervorgehoben.

3.5. Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen das Glykoprotein E2 von Pestiviren

3.5.1. Produktion des rekombinanten Glykoproteins E2 mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems

Das Baculovirus-Expressionssystem auf der Basis modifizierter Varianten des *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV) wird häufig für die heterologe Expression viraler Glykoproteine eingesetzt. Zu beachten ist dabei, dass sich einige posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierung) in Insektenzellen von denen in Säugerzellen unterscheiden.

In dieser Arbeit wurde das E2-Glykoprotein des BVDV-1 Stammes CP7 sowie der BVDV-2 Stämme 890 und Gi-1 mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems exprimiert. Die Rekombinanten AcNPV-CP7/E2 und AcNPV-890/E2 exprimieren das komplette E2-Glycoprotein (mit Membrananker). Da das rekombinante E2 (rE2) in beiden Fällen nicht sezerniert wird, erfolgte die Proteingewinnung aus Extrakten infizierter Insektenzellen (SF-21). Im Gegensatz dazu exprimiert die Rekombinante AcNPV-Gi1/E2 ein C-terminal verkürztes E2 ohne Membrananker, das von infizierten Insektenzellen effizient sezerniert wird und daher direkt aus dem Kulturüberstand gewonnen werden konnte. Die Expression erfolgte in allen Fällen unter Kontrolle des AcNPV Polyhedrin-Promotors. Um die Translokation des rE2 in das ER zu gewährleisten enthalten die Rekombinanten die E^{ms}-Signalsequenz am N-Terminus des rE2.

3.5.2. Reinigung rekombinanter Proteine aus Insektenzellen

Für die Extraktion des E2-Proteins (mit Membrananker) aus Insektenzellen wurde NP-40 als mildes nicht-ionisches Detergens in Kombination mit Glycerol in PBS eingesetzt. Das Detergens zerstört die Membranen und befreit die Proteine, das Glycerol senkt unspezifische Wechselwirkungen durch seinen "solvophobischen" Effekt und stabilisiert hydrophobe Membranproteine in Lösung (Unger, 1993).

Die Reinigung der rekombinant exprimierten Proteine erfolgte mittels Immunaффinitätschromatographie. Zur Herstellung von Protein-G Sepharose Immunaффinitätssäulen wurde ein zuvor gereinigter monoklonaler Antikörper gegen E2

(mAk D5; IgG₁) verwendet. Die Menge an mAk, die mittels Dimethylpimelimidat (DMP) kovalent an die Matrix gekoppelt wurde, war so gewählt, dass nur etwa 50% der Bindungskapazität der Protein-G Sepharose abgesättigt wurden. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Ak-Moleküle bevorzugt mit ihrem Fc Teil an das Protein G binden. Derartige Affinitätssäulen eignen sich zur Elution u.a. bei niedrigem pH-Wert (Schneider et al., 1982). Der Erfolg der Kopplung (Protein-G Sepharose/mAk D5) konnte mittels Coomassie-Färbung nach elektrophoretischer Auftrennung von Säulenmaterial unter reduzierenden Bedingungen vor und nach der Zugabe von DMP bestätigt werden.

Die Reinigung des rE2 sollte unter möglichst nativen Bedingungen durchgeführt werden. Zellextrakte von Insektenzellen, die mit den Rekombinanten AcNPV-CP7/E2 oder AcNPV-890/E2 infiziert wurden bzw. Kulturüberstand von AcNPV-Gi1/E2 infizierten Insektenzellen wurden vor der Beschickung der Säulen mit 1mM PMSF (Phenylmethyl-Sulfonylfluorid) versetzt, um die proteolytische Degradation der rekombinanten Proteine zu verhindern. Nach Elution bei niedrigem pH wurden die Fraktionen sofort mit 1/10 Volumen von Tris-HCl pH 8 neutralisiert. Die Untersuchung der verwendeten Zellextrakte, Säulendurchläufe, Wasch- und Elutionsfraktionen erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen im Immunoblot (Abb. 17).

Fraktionen, die große Mengen des gesuchten Proteins enthielten, wurden gepoolt, eingeeengt und in PBS umgepuffert. Die so behandelten Präparationen wurden parallel im Immunoblot und in der Proteinsilberfärbung untersucht (Abb. 18a bis d).

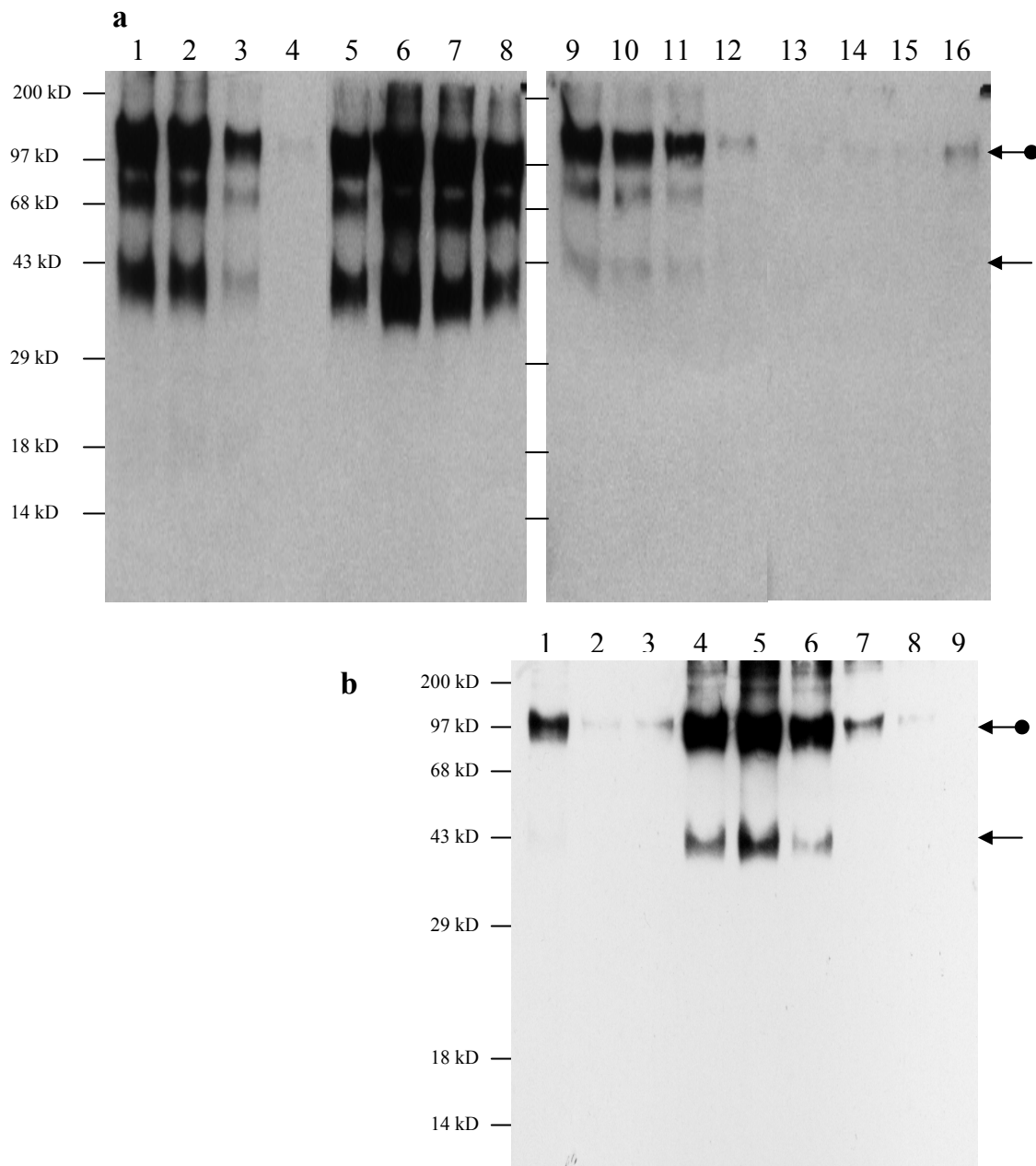


Abb. 17: E2-Reinigung aus Insektenzellen (SF-21) nach Infektion mit Baculovirus-BVDV Rekombinanten (Immunoblot mit dem mAk D5): rE2 wurde aus infizierten SF-21 Zellen gewonnen und mit Hilfe einer Immunaффinitätssäule gereinigt. Identische Mengen jeder Fraktion wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis des E2 erfolgte unter Verwendung des mAk D5. **Abb. 17a:** rE2 von BVDV-1 CP7 **Spuren 1,2.** Zellextrakte (ZE) infizierter SF-21 Zellen vor der Immunaффinitätssäule. **3.** Durchlauf, **4-12.** Elutionsfraktionen, **13-16.** Waschpufferfraktionen. **Abb. 17b:** rE2 von BVDV 2 890, **Spur 1.** Zellextrakt (ZE) infizierter SF-21 Zellen. **2.** Durchlauf, **3-9.** Elutionsfraktionen, **←●** E2-Dimer. **←** E2-Monomer.

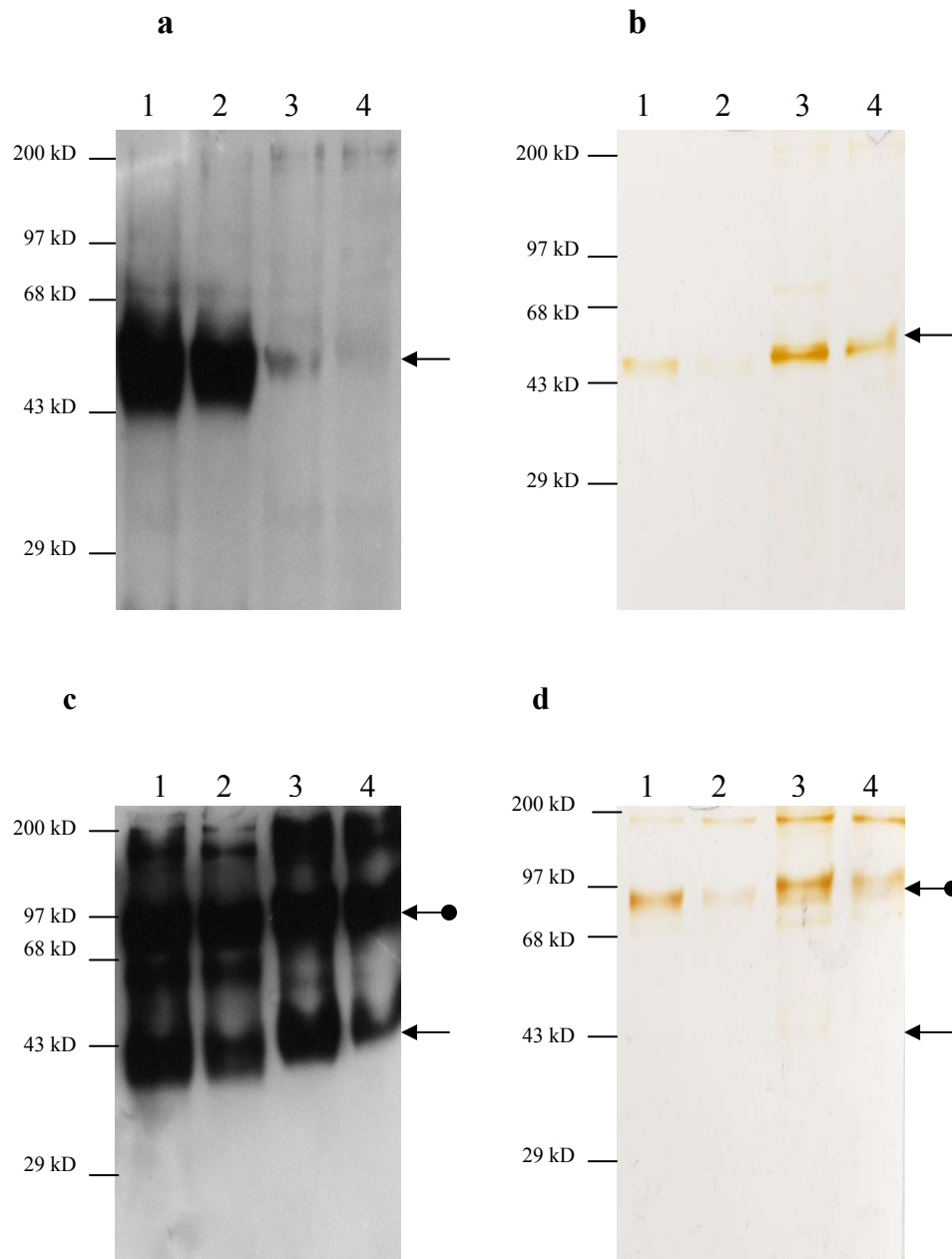


Abb. 18: Immunoblot und Silber-Färbung von gereinigtem rE2-Glykoprotein. Gepoolte Elutionsfraktionen wurden eingeeengt und umgepuffert; identische Mengen wurden unter reduzierenden (a, b) und nicht reduzierenden Bedingungen (c, d) über SDS-PAGE aufgetrennt. Das E2-Glycoprotein wurde mit dem mAk WB214 (a) bzw. dem mAk D5 (c) nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran detektiert. Parallel wurden SDS-PAGE Gele einer Silberfärbung unterzogen (b und d). **Spuren 1, 2.** rE2 von BVDV-1 CP7, **3,4.** rE2 von BVDV-2 890. **←●** E2-Dimer. **←** E2-Monomer.

Unter reduzierenden Bedingungen trat eine Bande von ca. 50-53 kD auf, die der erwarteten Größe des E2-Monomers entspricht (Abb. 18a und b). Unter nicht reduzierenden Bedingungen war eine Bande von ca. 42 kD nachweisbar, die dem E2-Monomer entspricht und eine Bande von ca. 90 kD, die einem E2-Dimer entspricht. Das unterschiedliche Migrationsverhalten der E2-Monomere unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen resultiert vermutlich aus der Auffaltung der Proteine in Folge der Reduktion intramolekularer Disulfidbrücken. Eine weitere prominente Bande von ca. 70-75 kD wurde in Elutionsfraktionen mit dem rE2 von BVDV-1 CP7 nachgewiesen. Ob es sich dabei um ein Heterodimer mit einem unbekannten zellulären Protein oder ein proteolytisches Degradationsprodukt des rE2-Dimer handelt, ist nicht geklärt (Abb. 17a-b und 18c).

3.5.3. Immunisierung von Mäusen

Balb/c Mäuse wurden mit jeweils 3 µg gereinigtem rE2-Glykoprotein 3mal subkutan im Abstand von je 2 Wochen immunisiert. 15 Tage nach der dritten Immunisierung wurde Blut entnommen und für eine indirekte Immunfluoreszenz an mit Pestiviren infizierten Säugerzellen eingesetzt. Dabei waren in den Seren aller immunisierten Mäuse Antikörper gegen pestivirale Proteine nachweisbar. Um eine ausgeprägte anamnestiche Immunreaktion mit dem Ziel der Produktion spezifischer Antikörper des Subtyps IgG zu erreichen, wurden die drei letzten Boosterdosen intraperitoneal im Abstand von je 24 Stunden injiziert. Drei bis fünf Tage später erfolgte die Tötung der Mäuse und die Gewinnung der Milzzellen. Für die folgenden Fusionen wurden Splenozyten jeweils einer mit rE2 von BVDV-1 CP7 bzw. BVDV-2 890 immunisierten Maus verwendet.

3.5.4. Fusion von Splenozyten und Myelomzellen; Klonierung und Selektion von Hybridomzellen

Köhler und Milstein fanden 1975, dass antikörperproduzierende Zellen (Plasmazellen) immortalisiert werden können, wenn sie mit Myelomzellen fusionieren. Die daraus resultierenden Hybridzellen wurde "Hybridome" genannt. Der Name "monoklonale Antikörper" rührt von der Isolierung und Kultivierung definierter Hybridom-Klone her, die Antikörper einer Spezifität produzieren (Harlow, 1988; Howard, 2001).

Die von den immunisierten Mäusen gewonnenen Milzzellen wurden mit Myelomzellen (SP 2/0) unter Verwendung von Polyethylenglykol fusioniert. Nicht fusionierte Zellen wurden durch die Dauer der Kultur und den Einsatz von Selektionsmedium (HAT-Medium) eliminiert. 9 Tage nach der Fusion erfolgte das erste Screening mittels indirekter Immunfluoreszenz. Hierfür wurden mit den Stämmen BVDV-1 CP7 bzw. BVDV-2 890 infizierte MDBK-Zellen eingesetzt. Hybridomzellen aus positiv beurteilten Vertiefungen wurden kloniert, erneut getestet und mehrfach rekloniert. Ein Teil der Zellen wurde für spätere Verwendung und zur Sicherheit über flüssigem Stickstoff eingefroren. Abbildung 19 illustriert das gesamte Verfahren.

Beim ersten Screening der Zellkolonien aus den beiden Fusionen (Mutterklone) zeigte sich eine spezifische Reaktion der gebildeten Antikörper mit Antigenen von BVDV-1 CP7 bzw. BVDV-2 890. Alle positiv reagierenden Klone wurden im Laufe der weiteren Vermehrung und Reklonierung wiederholt auf die Produktion spezifischer Antikörper untersucht. Nach drei Reklonierungen wurden mehrere stabile antikörperproduzierende Zellklone aus einem Mutterklon (128G) für das rE2-Glykoprotein von BVDV-2 890 bzw. aus sechs Mutterklonen (31E, 411A, 412A, 65A, 91C, 98H) für das rE2-Glykoprotein von BVDV-1 CP7 erhalten.

3.5.6. Isotypisierung der gewonnenen monoklonalen Antikörper

Für die weitere Charakterisierung wurde jeweils ein Zellklon von jedem Mutterklon ausgewählt (s. Tab. 12). Der Überstand der ausgewählten Hybridome wurde zur Bestimmung des Ig-Subtypes und Isotypes der produzierten Antikörper eingesetzt. Ig-Subtypen und Isotypen, die häufig bei der Gewinnung monoklonaler Antikörper nach dem hier verwendeten Verfahren vorkommen, sind IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, und IgM; selten kommen IgA und IgE vor. Die ermittelten Ig-Subtypen und Isotypen der untersuchten Hybridome sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

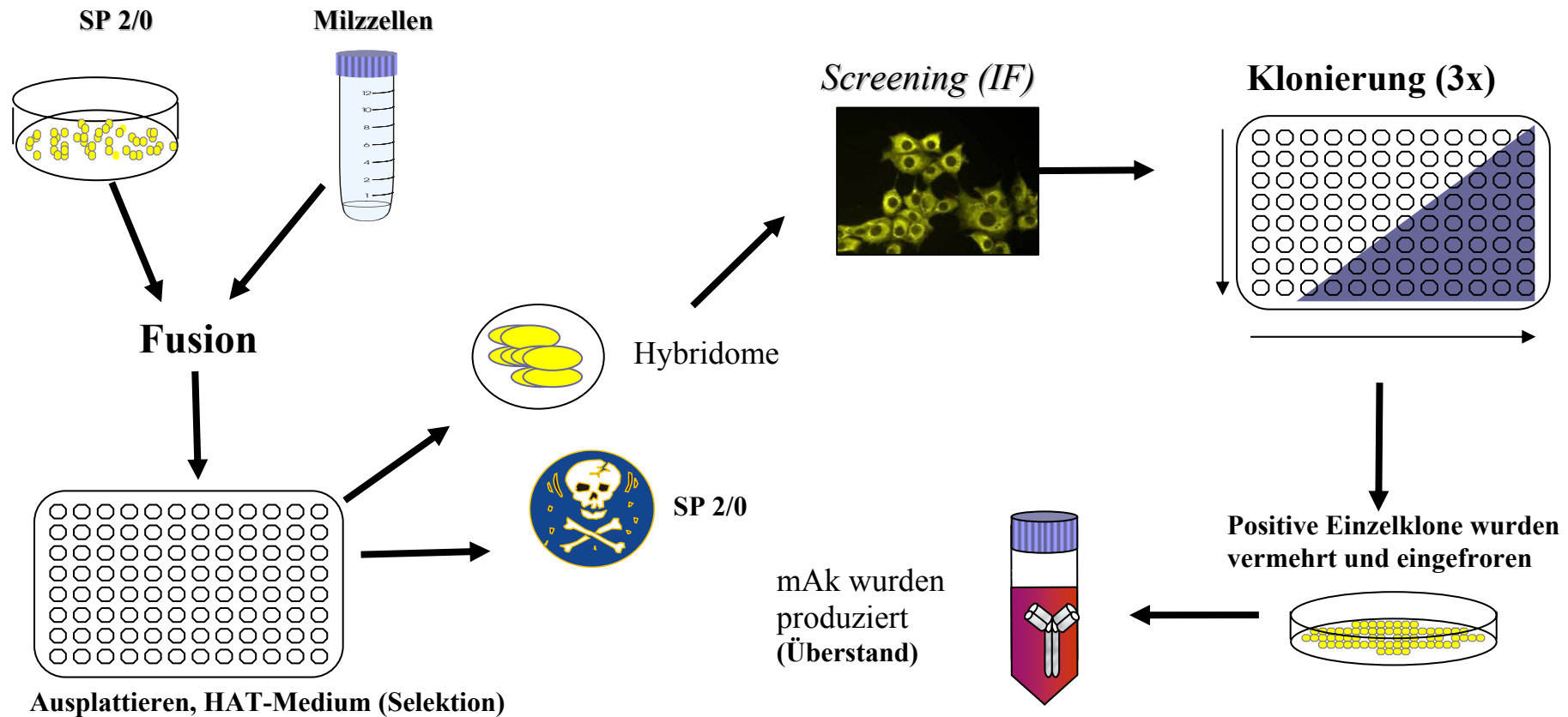


Abb. 19: Gewinnung monoklonaler Antikörper (mAk) (Übersicht). Nach Immunisierung einer Maus wurden Milzzellen gewonnen. Splenozyten und SP 2/0 Myelomzellen wurden mit Hilfe von Polyethylenglykol (PEG) fusioniert. Das Gemisch aus fusionierten Zellen (Hybridomzellen) und nicht fusionierten Zellen (SP 2/0, Lymphocyten, u.a.) wurde in HAT-Selektionsmedium (Hybridommedium mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) kultiviert. Hierin überleben nur die Hybride aus Splenozyten und Myelomzellen, die anderen Zellen sterben nach kurzer (SP 2/0) oder längerer Zeit (Lymphocyten und andere nicht fusionierte Zellen) ab. Die im IF-Test gefundenen positiven Kolonien wurden kloniert, getestet und mehrfach rekloniert. Ein Teil der Zellen wurde für spätere Verwendung und zur Sicherheit über flüssigem Stickstoff eingefroren, ein anderer Teil wurde weiterkultiviert, um die mAk in großem Maßstab zu produzieren.

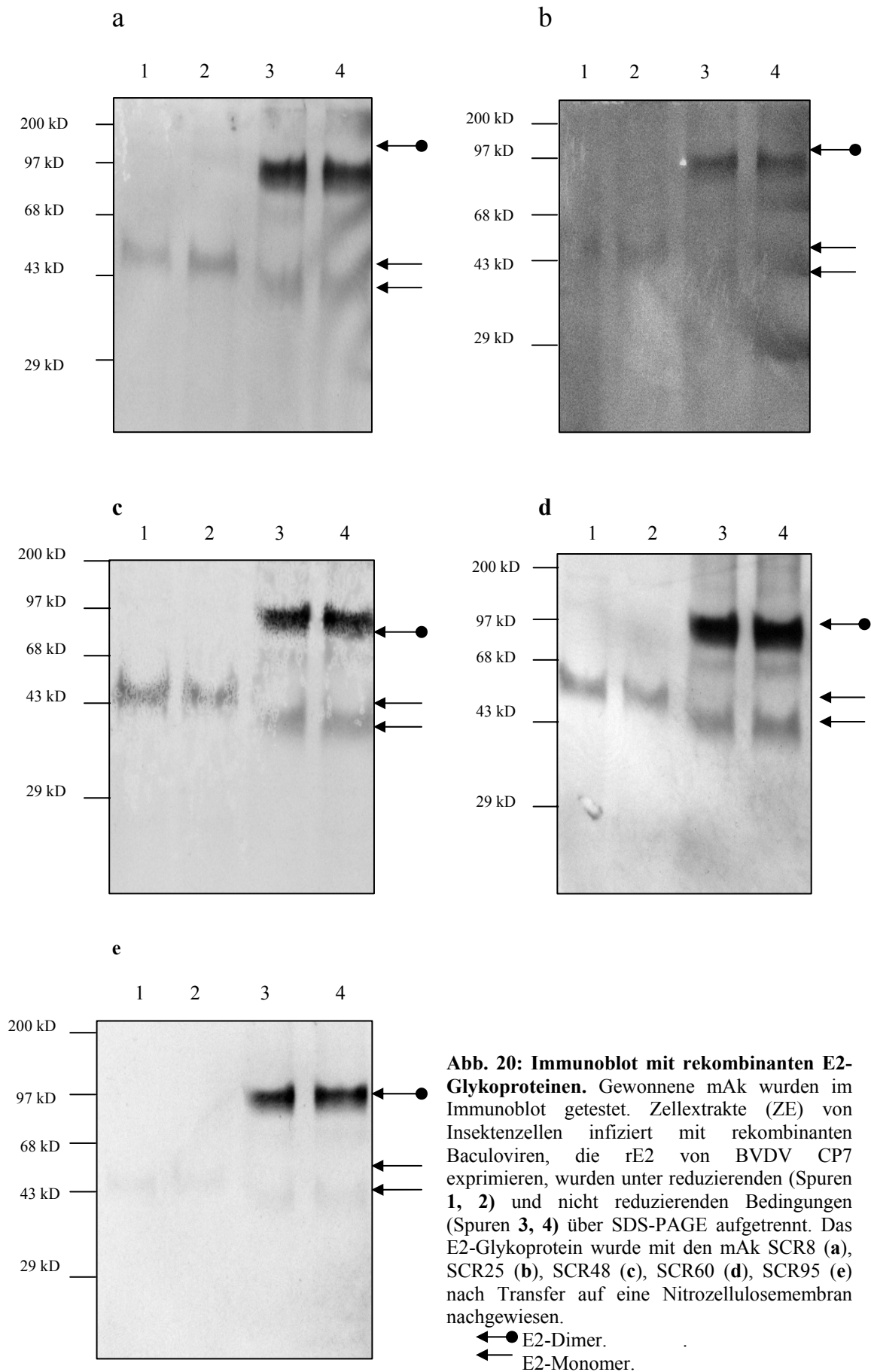
3.5.7. Reaktion der monoklonalen Antikörper im Immunoblot

Die Reaktivität der gewonnenen mAk im Immunoblot wurde unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen untersucht. Als Antigene fanden Zellextrakte infizierter (rE2 von BVDV-1 CP7 bzw. BVDV-2 890) und nicht infizierter Insektenzellen sowie infizierter (BVDV Stämme NADL, Deer-GB1 und RIT) und nicht infizierter MDBK-Zellen Verwendung. Die Antigene wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembranen mit den gewonnenen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 und den Abbildungen 20-22 zusammengefasst.

Nr.	Ursprünglicher Name	Antigen	Neuer Name	Ig-Subtyp/Isotyp	Immunoblot	
					Reduzierende Bedingungen.	Nicht reduzierende Bedingungen.
8	31E2F10C	CP 7	SCR8	IgG _{2b} κ	+	+
25	412A12D9C		SCR25	IgG _{2b} κ	+	+
95	411A9C1B		SCR95	IgG _{2b} κ	+	+
48	91C8H6F		SCR48	IgG _{2b} κ	+	+
60	65A3H7G		SCR60	IgG ₁ κ	+	+
78	98H10B1H		SCR78	IgG ₁ κ	-	+
4	128G5E10D3F	890	SCR4	IgG ₁ κ	-	+

Tabelle 12.: Eigenschaften der ausgewählten Hybridome. Überstände der 7 Hybridome wurden zur Bestimmung der Ig-Subklasse eingesetzt. Die Reaktivität der mAk im Immunoblot unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen wurde ermittelt.

Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigten alle mAk eine positive Reaktion mit den zur Immunisierung verwendeten Antigenen. Unter reduzierenden Bedingungen reagierten die mAk SCR8, SCR25, SCR95, SCR48 und SCR60 mit dem rE2-Glykoprotein von BVDV-1 CP7. Allerdings waren die Banden bei der Verwendung von Überständen der Hybridome SCR25 und SCR95 deutlich schwächer als bei den anderen mAk (Abb. 20).



Die mAk SCR78 und SCR4 erkannten das rE2 unter reduzierenden Bedingungen nicht (Abb. 21).

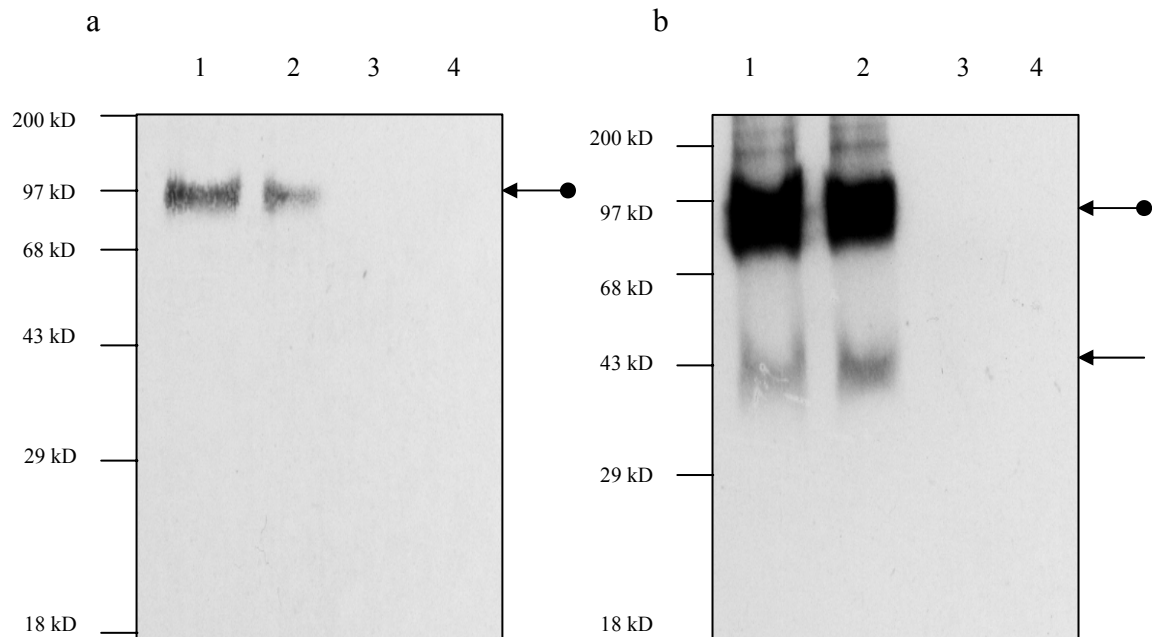


Abb. 21: Immunoblot mit rekombinanten E2-Glykoproteinen. Gewonnene mAk wurden im Immunoblot getestet. Zellextrakte (ZE) von Insektenzellen infiziert mit rekombinanten Baculoviren, die rE2 von BVDV CP7 (a) bzw 890 (b) exprimieren, wurden unter reduzierenden (Spuren 1, 2) und nicht reduzierenden Bedingungen (Spuren 3, 4) über SDS-PAGE aufgetrennt. Das E2-Glykoprotein wurde mit den mAk SCR78 (a) und SCR4 (b) nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran nachgewiesen. ◀● E2-Dimer, ◀ E2-Monomer.

Die Reaktivität monoklonaler Antikörper im Immunoblot wurde auch unter Verwendung von Zellextrakten aus mit BVDV (Stämme NADL, Deer-GB1 und RIT) infizierten MDBK-Zellen getestet (Abb. 22). Mit dem mAk SCR60 wurde ein E2-Monomer von ca. 42 kD und ein E2-Dimer von ca. 90 kD für beide Antigenpräparationen (AcNPV-CP7/E2 und BVDV NADL) nachgewiesen. Im Zellextrakt infizierter MDBK-Zellen konnte außerdem das E2/E1-Heterodimer (ca. 75 kD) nachgewiesen werden. Analoge Ergebnisse wurden für eine Antigenpräparation auf der Basis von BVDV RIT infizierter MDBK Zellen erzielt. Das E2-Protein von Deer-GB1 wurde nicht durch den mAk SCR60 erkannt.

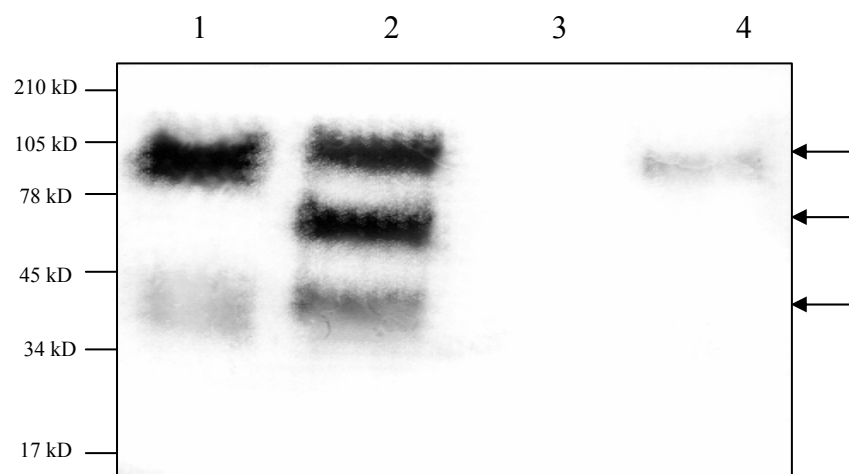


Abb. 22: Immunoblot mit rekombinantem und authentischem E2-Glykoprotein. Zellextrakte aus mit AcNPV-E2/CP7 infizierten SF-21 Zellen (1) und aus Pestivirus infizierten MDBK-Zellen (2 – 4) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde das E2-Protein mit dem mAk SCR60 nachgewiesen. **Spuren:** 1. rE2 (BVDV-1 CP7), 2. BVDV NADL 3. BVDV Deer-GB1. 4. BVDV RIT. Die Pfeile zeigen von oben nach unten das E2-Homodimer, das E2/E1-Heterodimer und das E2-Monomer.

3.5.8. Reaktionsspektrum der monoklonalen Antikörper (Immunfluoreszenz)

Das Reaktionsspektrum der mAk wurde durch indirekte Immunfluoreszenz getestet. Hierbei wurden eine Vielzahl von Pestiviren (Laborstämme, Impfvirusstämme und Feldvirusisolate) zur Infektion von MDBK-, PK-15 bzw. SFT-R-Zellen verwendet. Die Überstände von 4-5 Zellklonen je unabhängigem Mutterklon wurden separat getestet. Die beobachteten unterschiedlichen Reaktionsmuster der mAk sind in den Tabellen 13a und b gezeigt.

Nur ruminante Pestiviren, nicht jedoch das KSPV Isolat Alfort 187, wurden von den mAk erkannt.

Die verwendeten BVDV-1 Isolate aus den Subgruppen a, b, c, d, e, f, "e" und h wurden sämtlich von den mAk SCR25 und SCR95 erkannt, wobei die Reaktion gegen die Stämme Deer-GB1 und 519 schwach ausfiel (Abb. 23). Die anderen mAk aus der Fusion gegen rE2/BVDV-1 CP7 wiesen jeweils nur einen Teil der BVDV-1 Isolate (s. Tab. 13) nach. Bemerkenswert ist, dass der mAk SCR78 ausschließlich das Isolat CP7 erkannte. Der mAk SCR4 erkannte keines der getesteten BVDV-1 Isolate (Tab. 13a).

Von den verwendeten BVDV-2 Stämmen wurde das Isolat ED durch keinen der mAk nachgewiesen, wohl aber durch einen Kontrollantikörper gegen NS3 (Abb. 24). Die gegen BVDV-1 rE2 gewonnenen mAk zeigten insgesamt eine breite Reaktivität mit BVDV-2 Isolaten; mit Ausnahme des mAk SCR48, der keine BVDV-2a Stämme und auch nicht BVDV-2b Gi-5 erkannte, wiesen die mAk SCR25, SCR95, SCR8 und SCR60 alle verwendeten BVDV-2 Isolate (außer ED) nach. Der mAk SCR4 aus der Fusion gegen rE2 von BVDV-2 890 erkannte nur die Stämme Gi-2, 890 und das BDV Isolat SCP.

Die verwendeten BDV Stämme sowie die Isolate Giraffe 1 und Hobi wurden ebenfalls von verschiedenen mAk aus der Fusion gegen rE2 von BVDV-1 CP7 nachgewiesen; SCR25, SCR8 und SCR60 erkannten BDV-1a, 2 und 3 Isolate ebenso wie Giraffe 1 und Hobi. Der mAk SCR95 erkannte nur BD-31, AZ79, Giraffe 1 und Hobi, SCR48 reagierte mit Giraffe 1 sowie schwach mit AZ79. SCR78 und SCR4 erkannten keines der vorgenannten Isolate (s. Tab. 13b). Die Abbildungen 25 bis 29 stellen einige Immunfluoreszenz-Reaktionen der mAk beispielhaft dar.

mAk	BVDV-1														
	a				b					c	d	e	f	„e“	h
	200085	C86	Oregon	NADL	Osloss	CP7	NY	5785	RIT	519	721	Deer-GB1	11468	S10	Leon-6
SCR25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+
SCR95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	+	+
SCR48	(+)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	(+)	-	+	+
SCR8	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
SCR60	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	(+)	-	+
SCR78	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCR4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 13a.: Reaktionsspektrum der gewonnenen mAk: Kulturzellen wurden mit verschiedenen Pestivirusisolaten infiziert und in der indirekten Immunfluoreszenz mit den neu gewonnenen mAk eingesetzt. + positive Reaktion; - negative Reaktion; (+) fragliche Reaktion

mAk	BVDV-2								BDV				CSFV	Gi ra ffe	H o b i
	a				b				1a		2	3	b		
	Gi-2	890	SCP	ED	Gi-4	Gi-5	Gi-6	Soldan	X818	BD-31	AZ79	Gifhorn	Alfort 187		
SCR25	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
SCR95	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
SCR48	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	(+)	-	-	+	-
SCR8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
SCR60	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	(+)
SCR78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCR4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 13b.: Reaktionsspektrum der gewonnenen mAk: Kulturzellen wurden mit verschiedenen Pestivirusisolaten infiziert und in der indirekten Immunfluoreszenz mit den neu gewonnenen mAk eingesetzt. + positive Reaktion; - negative Reaktion; (+) fragliche Reaktion

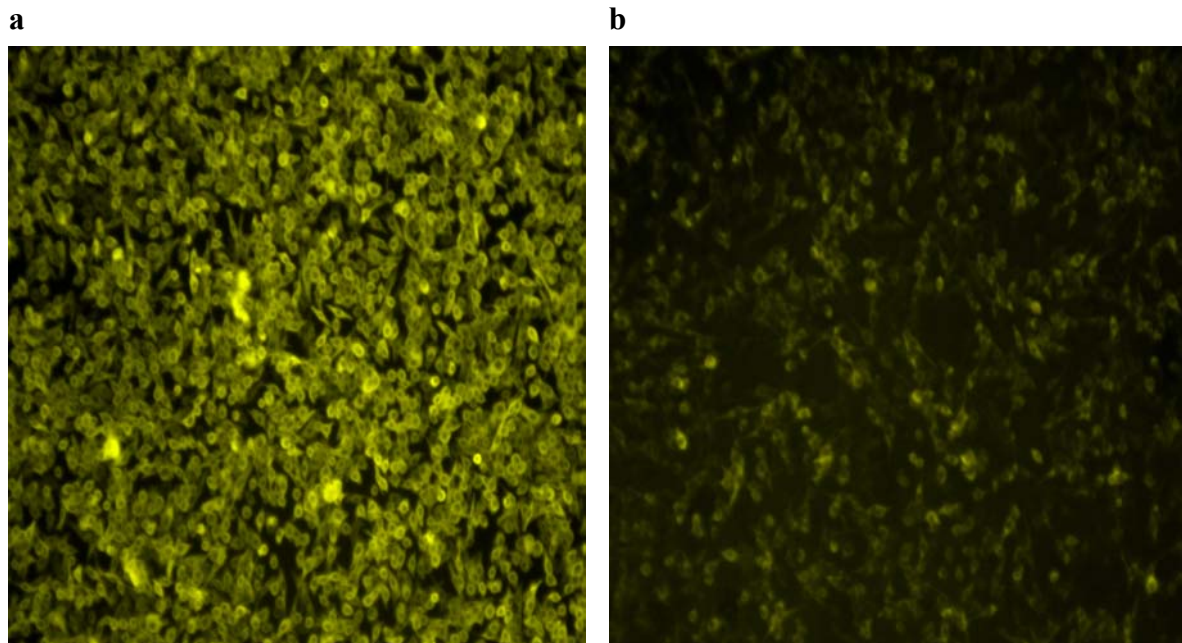


Abb. 23: Immunfluoreszenz mit den mAk Code 4 (gegen NS3, Kontrollreaktion) und SCR25. MDBK-Zellen wurden nach Infektion mit dem Stamm BVDV-1e Deer-GB1 fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz getestet (Primärantikörper: **Code 4 (a)** und **SCR25 (b)**, Detektionsantikörper: Ziege anti-Maus-Cy3).

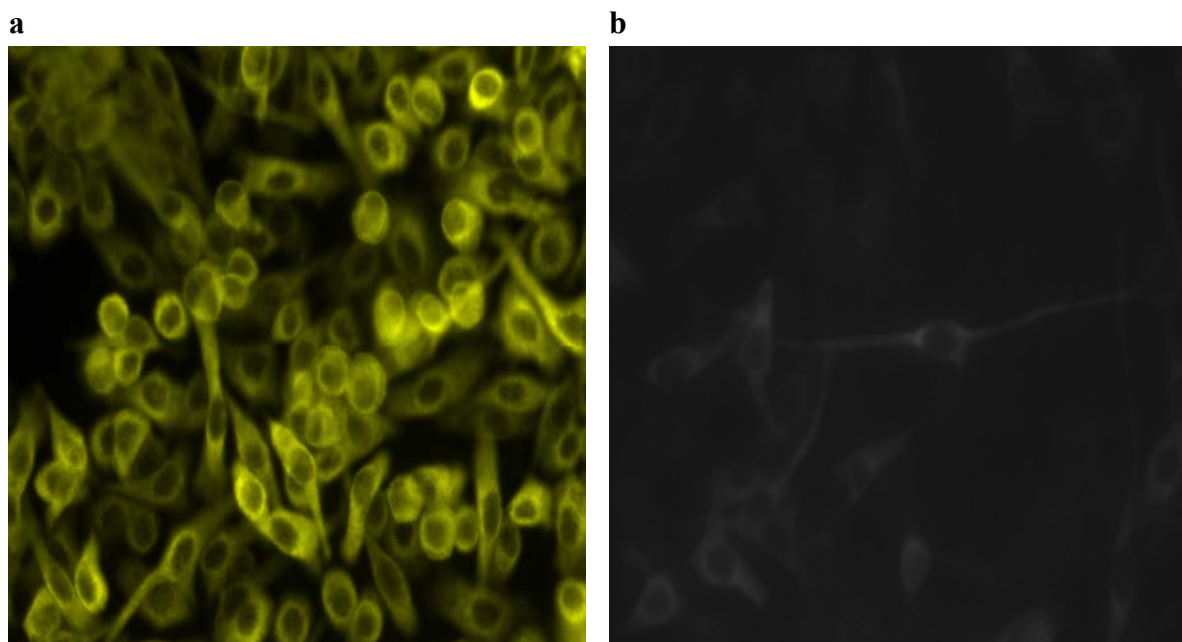


Abb. 24. Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR4. Nach Infektion mit dem Stamm BVDV-2a ED wurden MDBK-Zellen fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz getestet (Primärantikörper: **Code 4 (a)** und **SCR4 (b)**, Detektionsantikörper: Ziege anti-Maus-Cy3).

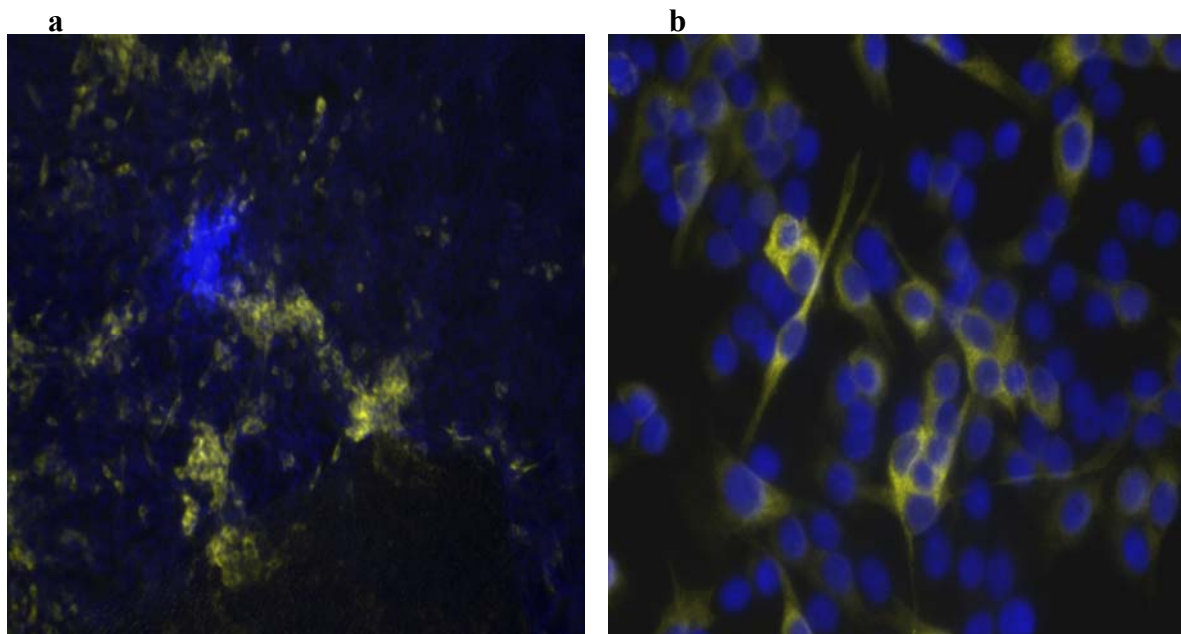


Abb. 25: Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR4. MDBK-Zellen wurden nach Infektion mit den Stämmen BVDV-2a Gi-2cp (a) bzw. SCP (b) fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz getestet (Primärantikörper: SCR4, Detektionsantikörper: Ziege anti-Maus-Cy3; Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt).

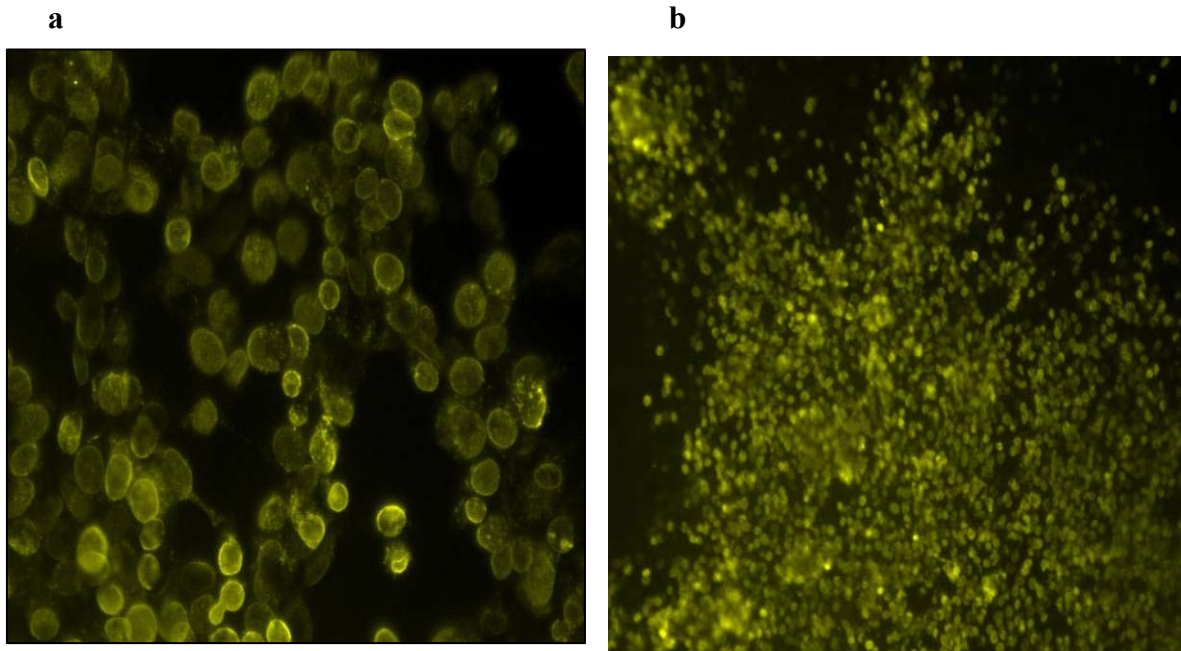


Abb. 26: Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR8. Mit den Stämmen Giraffe-1 (a) bzw. und BVDV-1a C86 (b) infizierte MDBK-Zellen wurden fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz getestet (Primärantikörper: SCR8, Detektionsantikörper: Ziege anti-Maus-Cy3).

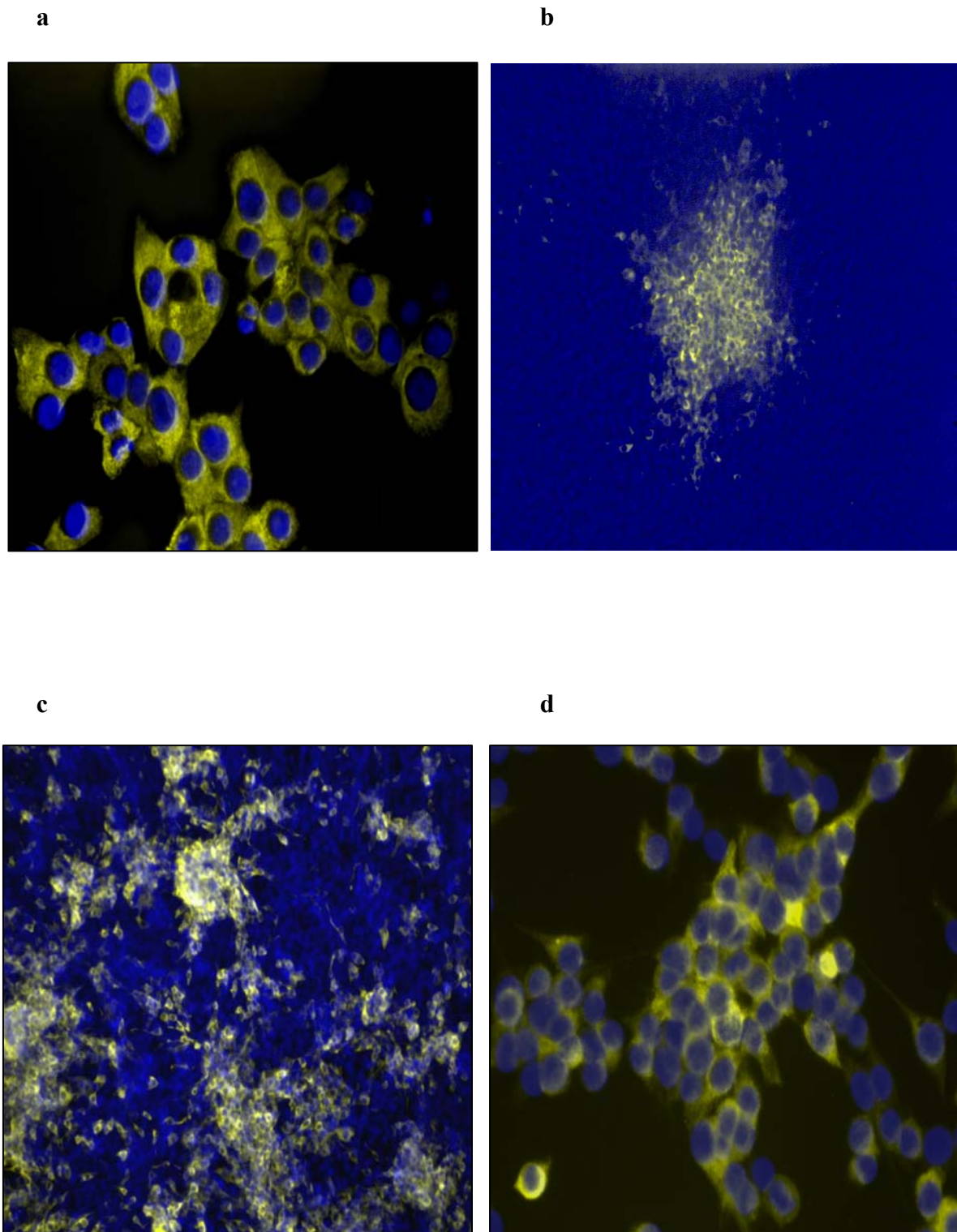


Abb. 27: Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR25. Nach Infektion mit den Stämmen BVDV-1a NADL (a), BVDV-1b CP7 (b), BVDV-2a Gi-2cp (MDBK) (c) bzw. BDV-2a AZ79 (SFT-R) (d) wurden Zellen fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz getestet (Primärantikörper: **SCR25**, Detektionsantikörper: Ziege anti-Maus-Cy3; Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt).

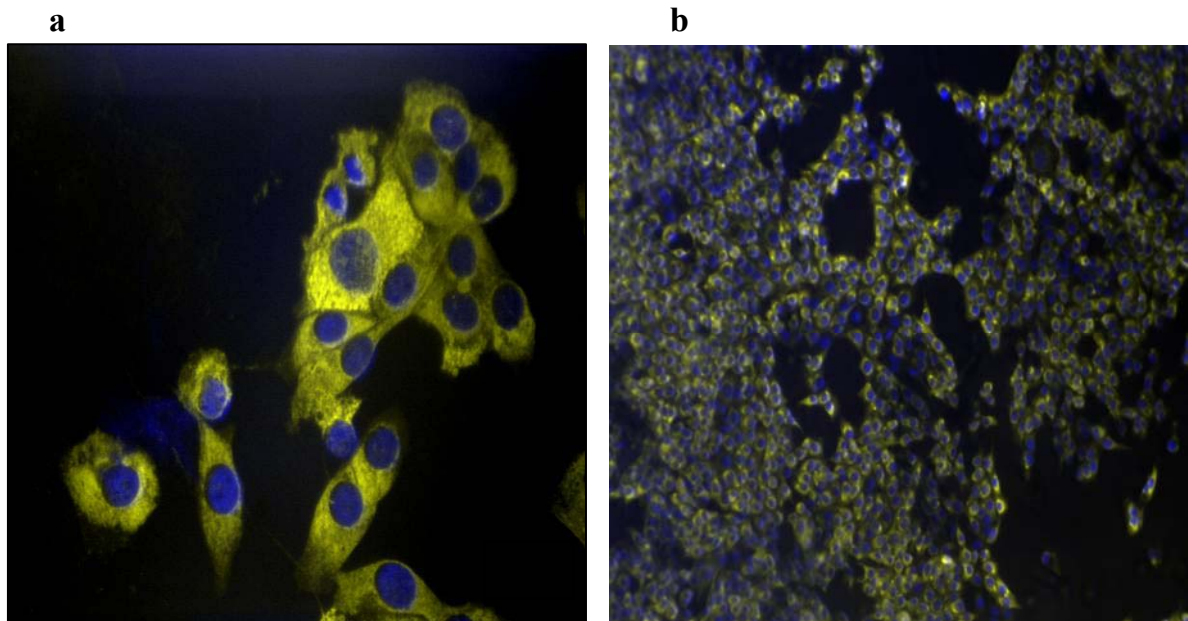


Abb. 28: Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR48. MDBK-Zellen nach Infektion mit dem Stamm BVDV-1a NADL wurden fixiert und in der indirekten Immunfluoreszenz eingesetzt (Primärantikörper: **SCR48**, Detektionsantikörper: Ziege anti-Maus-Cy3; Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt).

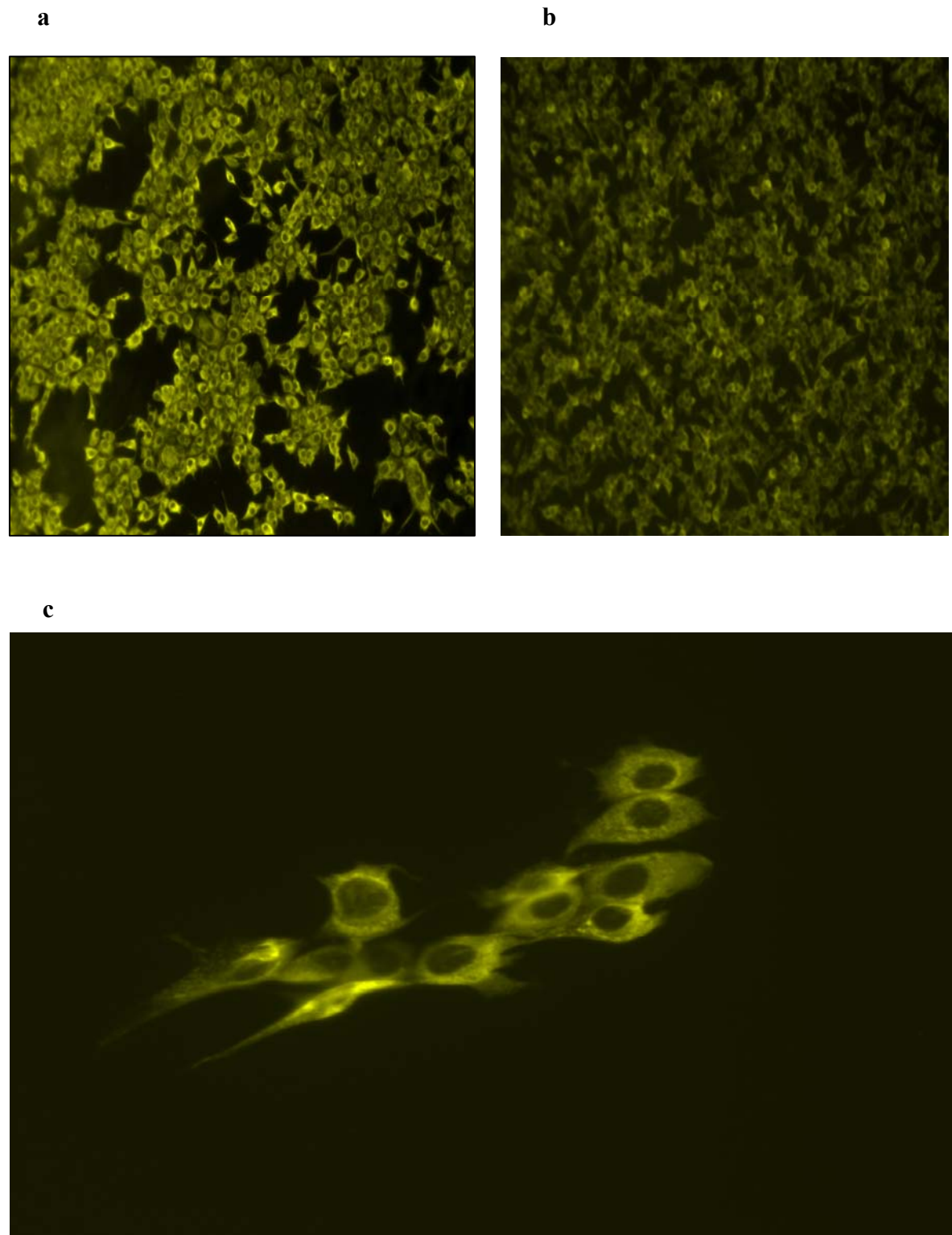


Abb. 29: Immunfluoreszenz mit dem mAk SCR60. Mit den Stämmen BVDV-1a NADL (**a, c**) bzw. BDV-3 Gifhorn (**b**) infizierte MDBK-Zellen wurden fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz getestet (Primärantikörper: **SCR60**, Detektionsantikörper: Ziege anti-Maus-Cy3).

3.5.9. Serumneutralisationstest (SNT)

Im Verlauf einer Infektion mit Pestiviren richtet sich die humorale Immunantwort immunkompetenter Tiere vor allem gegen die Strukturproteine E2 und E^{ms} sowie gegen die Nicht-Strukturproteine NS2-3 bzw. NS3. Neutralisierende Antikörper werden insbesondere gegen E2 gebildet und lassen sich experimentell durch einen Serumneutralisationstest nachweisen.

Im vorliegenden Fall wurde der SNT zur weiteren Charakterisierung der neu gewonnenen mAk SCR4, SCR 25, SCR60 und SCR95 eingesetzt. Als Testviren wurden die zytopathogenen Isolate Osloss (BVDV-1b) und Gi-2cp (BVDV-2a) verwendet. Die beiden Isolate wurden ausgewählt, da sie in der Routinediagnostik des Instituts für Virologie für SNTs eingesetzt werden. Beide Isolate sind eng mit den zur Gewinnung der mAk verwendeten BVD-Viren BVDV-1b CP7 bzw. BVDV-2 890 verwandt. Die resultierenden Neutralisationstiter sind in $\log_{10}ND_{50}$ in der Abb. 30 dargestellt. Die mAk SCR25, SCR60 und SCR95 zeigten eine eindeutige neutralisierende Aktivität. Bemerkenswert ist das Fehlen neutralisierender Eigenschaften von SCR95 gegenüber BVDV-1b. Der mAk SCR4 neutralisierte keines der Testviren.

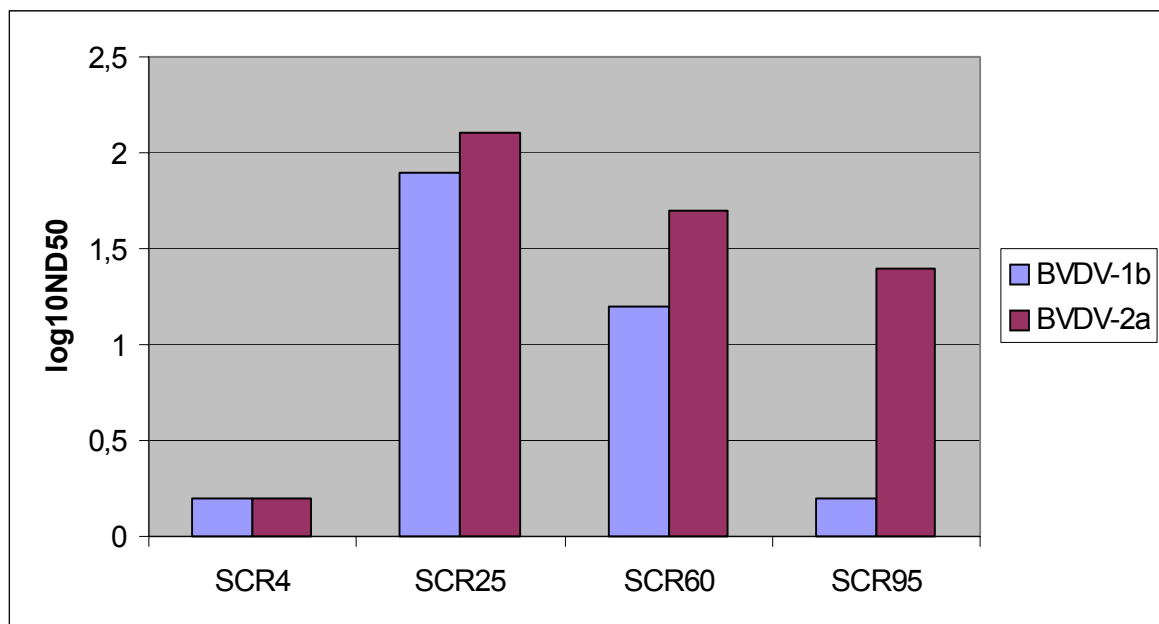


Abb. 30: Reaktion der mAk im SNT. Die Neutralisationstiter der mAk wurden im SNT gegen die Virusisolate BVDV-1b Osloss und BVDV-2a Gi-2cp bestimmt. Die mAk wurden in einer Konzentration von 1mg/ml eingesetzt und in 3er Stufen titriert. Die Neutralisationstiter sind in $\log_{10}ND_{50}$ angegeben.

3.5.10. Immunelektronenmikroskopie

Pestiviruspartikel lassen sich aufgrund ihrer im Negativkontrast unauffälligen Morphologie elektronenmikroskopisch nur schwer nachweisen. Einen Ausweg bietet die Immunelektronenmikroskopie unter Verwendung von Antikörpern gegen Epitope, die auf der Oberfläche von Virionen exponiert sind. Um die Eignung der neu gewonnenen mAk für die Oberflächenmarkierung von Pestivirionen zu untersuchen, mussten zunächst Virionen gereinigt werden.

3.5.10.1. Dichtegradienten-Reinigung von Virionen

Zur Reinigung und Konzentrierung von Virionen wird routinemäßig die präparative Ultrazentrifugation eingesetzt. Bei Pestiviren wurden bereits verschiedene Gradientenmaterialien in Form von kontinuierlichen Gradienten oder Stufengradienten verwendet (Sucrose-, Natrium-, Kalium-, Tartratgradienten, u.a.) (Unger, 1993). Seit einiger Zeit wird Iodixanol (OptiPrep[®], Fa. AXIS-SHIELD PoC AS) erfolgreich für die Reinigung von Viruspartikeln eingesetzt (Lee et al., 1999; Lenz et al., 2000; Dettenhofer und Yu, 1999; Fujisawa et al., 2001; Peitschmann et al., 2002).

Zur Präparation von Pestiviruspartikeln wurde der Stamm BVDV-1a NADL in Zellkultur ohne FBS vermehrt und der virushaltige Kulturüberstand durch Ultrafiltration konzentriert. Pestiviruspartikel weisen eine ausgeprägte Neigung zur Assoziation u.a. mit Serumproteinen auf, so dass serumfreie Kulturüberstände einen Vorteil bei der Reinigung bieten. Die präparative Ultrazentrifugation erfolgte mit Sucrose- bzw. Iodixanol-Stufengradienten. Bei Verwendung von Sucrosegradienten konnte in einem Dichtebereich von 1.113 bis 1.131 g/cm³ mittels Infektiositätstest die höchste Konzentration von infektiösen Viruspartikeln festgestellt werden. Allerdings ließen sich elektronenmikroskopisch keine Viruspartikel darstellen. Bei den Iodixanol-Gradienten wurden die Gradientenfraktionen mit Hilfe des Immunoblot auf virales E2-Glykoprotein getestet. Die größte relative Menge von E2 wurde bei einer Dichte von 1.11 g/cm³ nachgewiesen. Die entsprechenden Fraktionen wurden mittels Filtration nochmals konzentriert und in PBS umgepuffert.

3.5.10.2. Immunelektronenmikroskopie

Für die Immunogoldmarkierung wurden Viruspartikel an Trägernetze adsorbiert und mit den mAk SCR8, SCR25, SCR60 bzw. SCR95 markiert; als Detektionsantikörper wurde ein mit kolloidalem Gold markiertes Ziege anti-Maus- IgG Konjugat (Fa. Biocell) verwendet. Der Nachweis des E2-Glycoprotein auf der Oberfläche von NADL-Virionen gelang nur unter Verwendung des mAk SCR60. Die Abbildung 31 zeigt polymorphe sphärische Partikel einer Größe von rund 60nm, an deren Oberfläche sich Goldkügelchen befinden. Bei den Partikeln handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Virionen von Pestiviren.

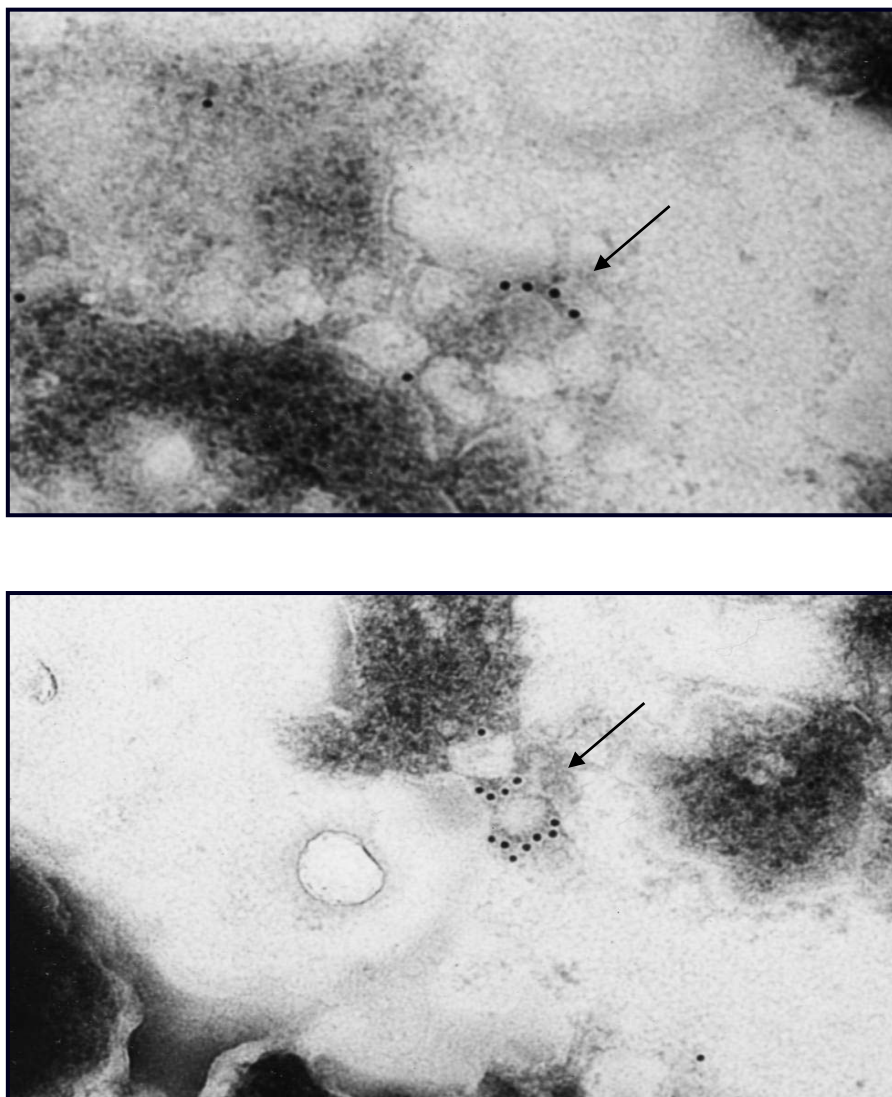


Abb. 31: Immunelektronenmikroskopie. Gradientengereinigte NADL-Virionen (Iodixanol) wurden an Trägernetzen adsorbiert und mit dem mAk SCR60 inkubiert. Als Detektionsantikörper wurde ein Ziege anti-Maus Goldkonjugat verwendet (Negativkontrastierung mit 2% Methylaminwolframat). Die Pfeile weisen auf die markierten Viruspartikel hin.

3.5.11. Etablierung eines ELISA-Systems zum Nachweis und zur Quantifizierung von E2

Zum labordiagnostischen Nachweis von BVD-Virusantigenen sind seit 1991 verschiedene Antigen-Capture-ELISAs entwickelt worden (Brinkhof et al., 1996; Crevat et al., 1993; Entrican et al., 1995; Fenton et al., 1991; Greiser-Wilke et al., 1993; Ludemann und Katz, 1994). Diese ELISAs bieten gegenüber dem Virusnachweis in der Zellkultur die Möglichkeit einer Automatisierung und somit der Beschleunigung sowie Vereinfachung der BVD-Virusantigen-Diagnostik.

Die verschiedenen Testformate unterscheiden sich vor allem hinsichtlich der verwendeten Antikörper. So können sowohl als Capture- als auch als Detektionsantikörper polyklonale polyspezifische Hyperimmunseren, monospezifische Hyperimmunseren, die durch Immunisierung von Versuchstieren mit einem definierten Virusprotein hergestellt wurden, oder monoklonale Antikörper eingesetzt werden (Crevat et al., 1993; Gottschalk et al., 1992; Greiser-Wilke et al., 1993; Shannon et al., 1991).

Die im Rahmen der Arbeit gewonnenen mAk wurden sowohl als Capture-Antikörper (mAk SCR4, SCR25, SCR60 und SCR95) als auch als Detektionsantikörper nach Biotinylierung (mAk SCR4, SCR25, SCR60 und SCR95) in verschiedenen Kombinationen getestet.

Zunächst sollte ein Sandwich-ELISA etabliert werden, der sich durch ein möglichst breites Spektrum erfasster Pestivirusisolate auszeichnen sollte. Hierzu wurden die mAk SCR25 und SCR60 ausgewählt. Beide mAk wurden in Verdünnungsstufen zur Beschichtung von Mikrotiterplatten eingesetzt, um die optimale Konzentration als Fängerantikörper zu ermitteln (Abb. 32). Als Antigene fanden 1:10 verdünnte Extrakte von Insektenzellen Verwendung, die mit rekombinanten Baculoviren infiziert wurden (rE2 von BVDV-1 CP7 und BVDV-2 890). Zur Kontrolle wurde PBS benutzt. Als Detektionsantikörper wurden dieselben mAk nach Biotinylierung verwendet. Dabei wurde SCR25-Biotin zum Nachweis der durch SCR60 gebundenen Antigene verwendet und umgekehrt. Die optimale Konzentration der Fängerantikörper lag bei etwa 250ng/well.

In einem zweiten Schritt wurden nun die biotinylierten Detektionsantikörper in Verdünnungsstufen in einem analogen Versuchsaufbau getestet (Abb. 33). Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit 200ng/well der gereinigten Fängerantikörper beschichtet. Als Antigene wurden gereinigte rE2 Präparationen verwendet (rE2 von BVDV-1 CP7 und BVDV-2 890 12,5ng/well). Die Detektionsantikörper SCR25-Biotin und SCR60-Biotin wurden in Konzentrationen von 1µg bis 0,48ng/well verwendet. Die optimale Konzentration der Detektionsantikörper lag zwischen 30 und 100ng/well.

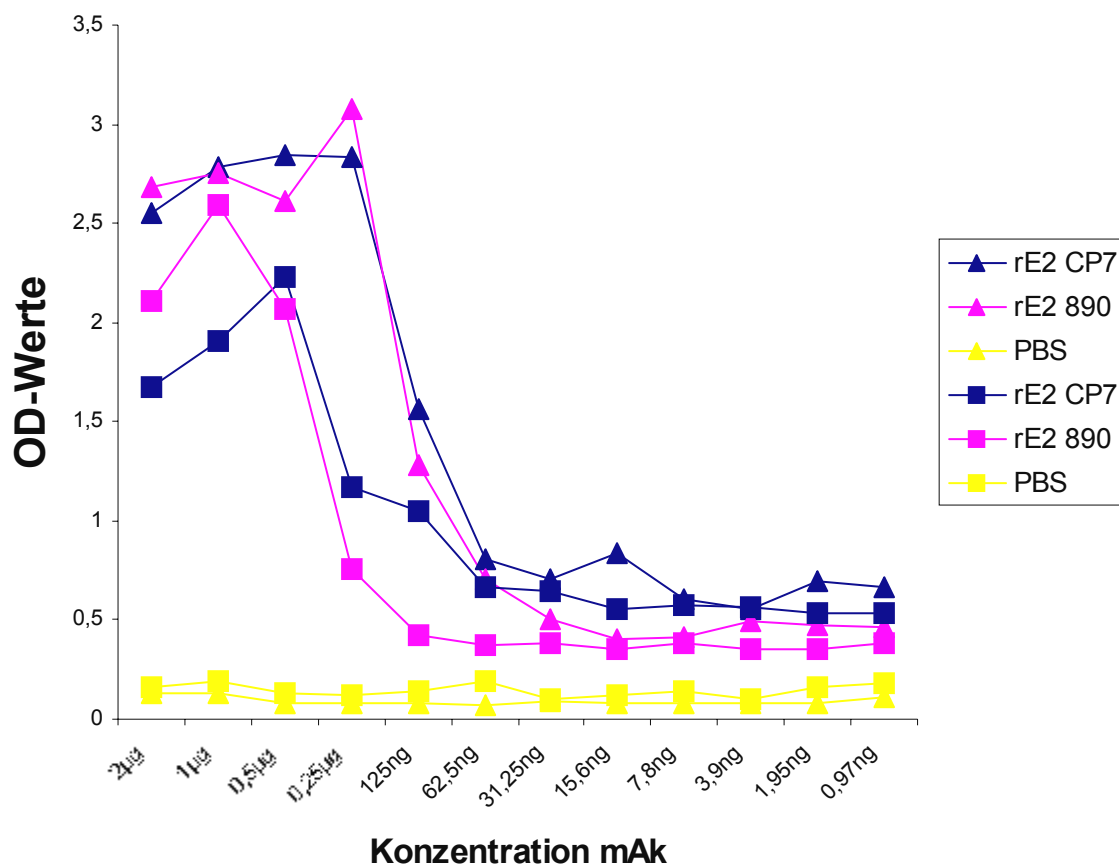


Abb. 32. Verdünnungsreihe der Fängerantikörper: mAk SCR60 und SCR25 wurden als Fängerantikörper in Verdünnungsstufen eingesetzt (2µg – 0,97ng/well). Als Antigene wurden Zellextrakte infizierter Insektenzellen (rE2 von BVDV-1 CP7 (blau) und BVDV-2 890 (magenta)) bzw. PBS (gelb) verwendet. Als Detektionsantikörper wurden biotinylierte mAk SCR25 bzw. SCR60 (jeweils 25ng/well) und ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase Konjugat benutzt. Dreiecke: Fängerantikörper SCR60, Detektionsantikörper SCR25-Biotin; Quadrate: Fängerantikörper SCR25, Detektionsantikörper SCR 60-Biotin.

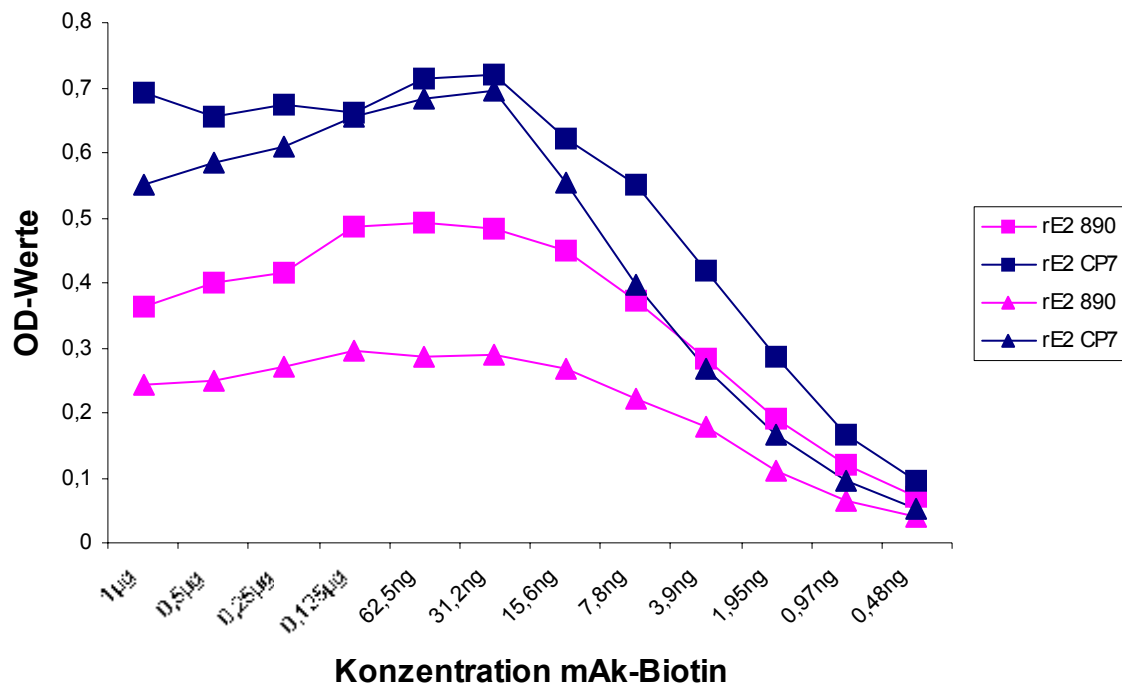


Abb. 33. Verdünnungsreihe der Detektionsantikörper: mAk SCR60-Biotin und SCR25-Biotin wurden als Detektionsantikörper in Verdünnungsstufen eingesetzt (1 µg – 0,48 ng/well). Mikrotiterplatten waren mit den mAk SCR25 bzw. SCR60 (jeweils 200 ng/well) beschichtet worden. Als Antigene wurden gereinigtes rE2 (CP7 (blau) und 890 (magenta)) verwendet. Dreiecke: Fängerantikörper SCR25, Detektionsantikörper SCR60-Biotin; Quadrate: Detektionsantikörper SCR60, Fängerantikörper SCR25-Biotin.

In einem weiteren Experiment wurde die Sensitivität des Sandwich-ELISA mit gereinigtem rE2 untersucht. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit einer Mischung der mAk SCR25 und SCR60 (jeweils 200 ng/well) beschichtet (Abb. 34). Als Antigene wurden gereinigte Präparationen von rE2 der Stämme BVDV-1 CP7, BVDV-2 890 und BVDV-2 Gi-1 in einer Konzentration von 500 ng bis 0.48 ng/well verwendet. Zur Detektion wurde der biotinylierte mAk SCR25 (100 ng/well) benutzt. Mit dem vorgenannten Versuchsaufbau ließen sich zwischen 16 ng (rE2 von BVDV-2 Gi-1) und 2 ng (rE2 von BVDV-1 CP7) des gereinigten rE2 nachweisen.

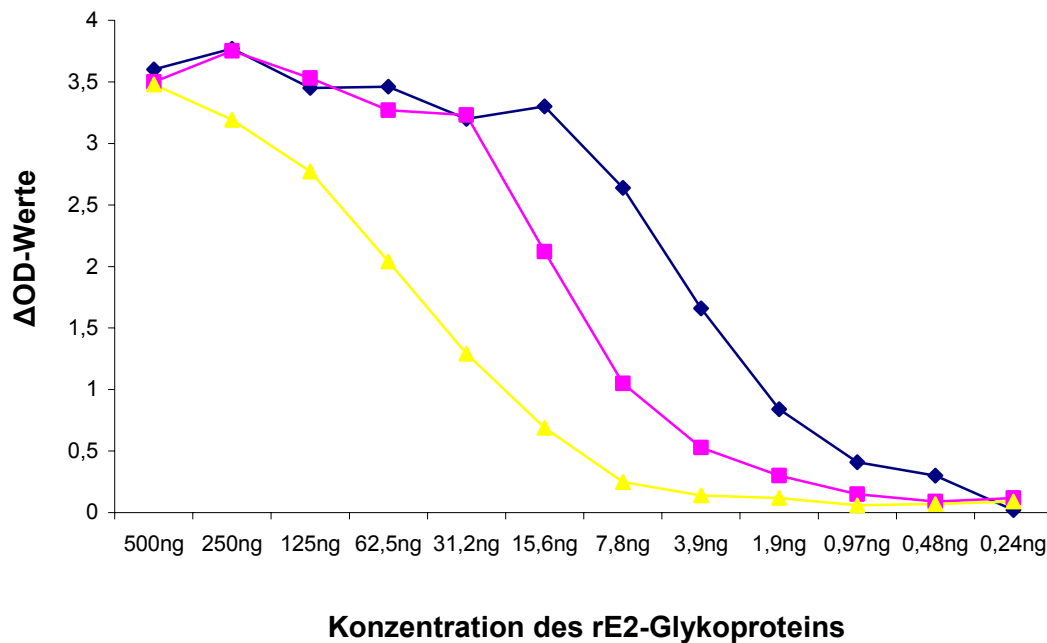


Abb. 34. Quantifizierung des rE2 mittels Sandwich-ELISA: Mikrotiterplatten wurden mit einer Mischung der mAk SCR25 und SCR60 (jeweils 200ng/well) beschichtet. Als Antigene wurden gereinigte Präparationen von rE2 der Stämme BVDV-1 CP7 (blau), BVDV-2 890 (magenta) und BVDV-2 Gi-1 (gelb) in einer Konzentration von 500ng bis 0,48ng/well verwendet. Zur Detektion wurde der biotinylierte mAk SCR25 (100ng/well) benutzt. $\Delta OD\text{-Werte} = OD_{rE2} - OD_{mock}$

Um die Spezifität des Sandwich-ELISA zu untersuchen wurden Extrakte von Zelllinien verwendet, die zuvor mit unterschiedlichen Virusstämmen infiziert wurden (Tab. 14). Hierzu wurde Mikrotiterplatten mit einer Mischung der mAk SCR25 und SCR60 beschichtet (jeweils 200ng/well). Je 50 μ l der Zellextrakte (s.o.) wurden in dem ELISA eingesetzt. Zur Detektion fand wiederum der biotinylierte mAk SCR25 Verwendung (100ng/well) (Abb. 35). Mit Ausnahme der Stämme KSPV Brescia und BVDV-1e "Deer" Deer-GB1 wurden alle getesteten Virusstämmen detektiert (Abb. 35).

Spezies	Subgruppe	Stamm	Spezies	Subgruppe	Isolat
BVDV-1	a	C86	BVDV-2	a	Gi-1
		NADL			Gi-2
		Oregon			890
		Singer			ED
	b	5785		b	SCP
		Osloss			Gi-4
		NCP7			Gi-6
		RIT (Rispoval)			Soldan
	c	519	BDV-1	a	BD-31
	d	721			X818
		821		b	V2526
		871	BDV-2	a	17385
Hobi	e "Deer"	Deer-GB1	BDV-3	-	Gifhorn
	f	11468	KSPV	b	Alfort 187
	"e"	S10			Brescia
		5322			CSFV ATCC
Hobi	-	Hobi	Giraffe	-	Giraffe-1

Tab. 14. Tabellarische Auflistung der im ELISA verwendete Pestivirusisolate.

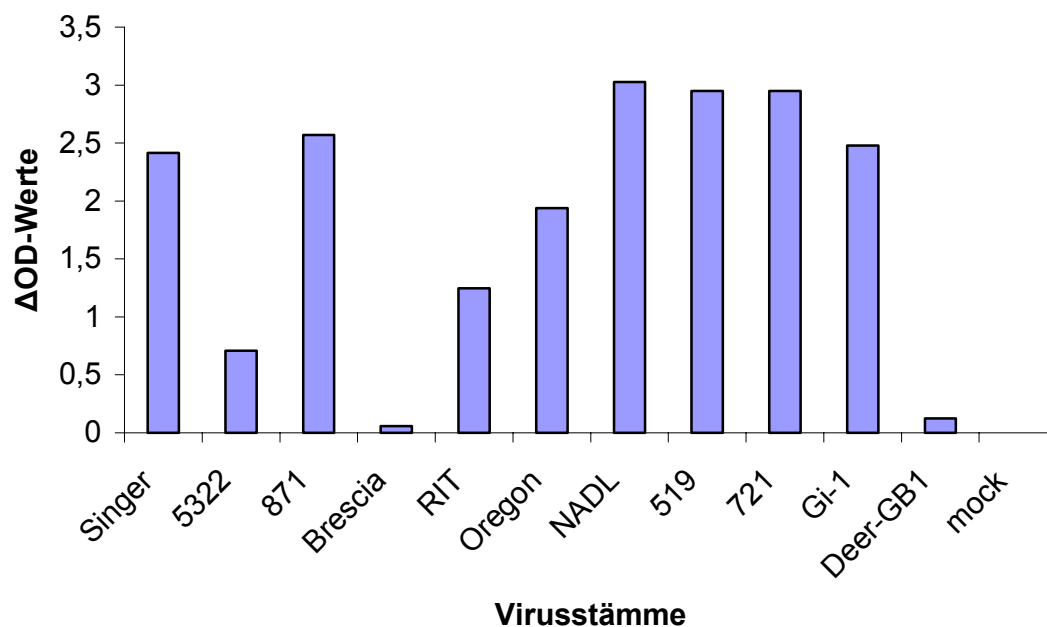


Abb. 35. Spezifität des Sandwich-ELISA (Zellextrakte infizierter Zellen): Die Spezifität des ELISA wurde unter Verwendung von Extrakten infizierter Zelllinien getestet. Als Kontrolle wurden mock-infizierte MDBK-Zellen verwendet. $\Delta OD\text{-Werte} = OD_{\text{Testvirus}} - OD_{\text{mock}}$.

Neben Extrakten aus infizierten Zelllinien wurden auch virushaltige Kulturüberstände im ELISA eingesetzt. Dabei zeigten einige Virusstämme wie BVDV-2 890, BVDV-1 Osloss und RIT sowie BDV X818 und BD31 ein starkes Signal, während die anderen Pestiviren nur schwache Signale aufwiesen (Abb. 36). Die Ursache für das Verhalten unterschiedlicher Kulturüberstände im ELISA ist unklar und lässt sich nur in einigen Fällen durch das Reaktionsspektrum der eingesetzten mAks erklären. Oregon, S10, 11468, Deer-GB1, Hobi und Alfort wurden durch den mAk SCR60 nicht oder nur schwach erkannt (s. Tab.13a und b). Das gleiche gilt für die Isolate Deer-GB1 und Alfort in Kombination mit dem mAk SCR25. Ob die Signalintensität die Menge der in den Überständen enthaltenen Virionen widerspiegelt, wurde nicht untersucht.

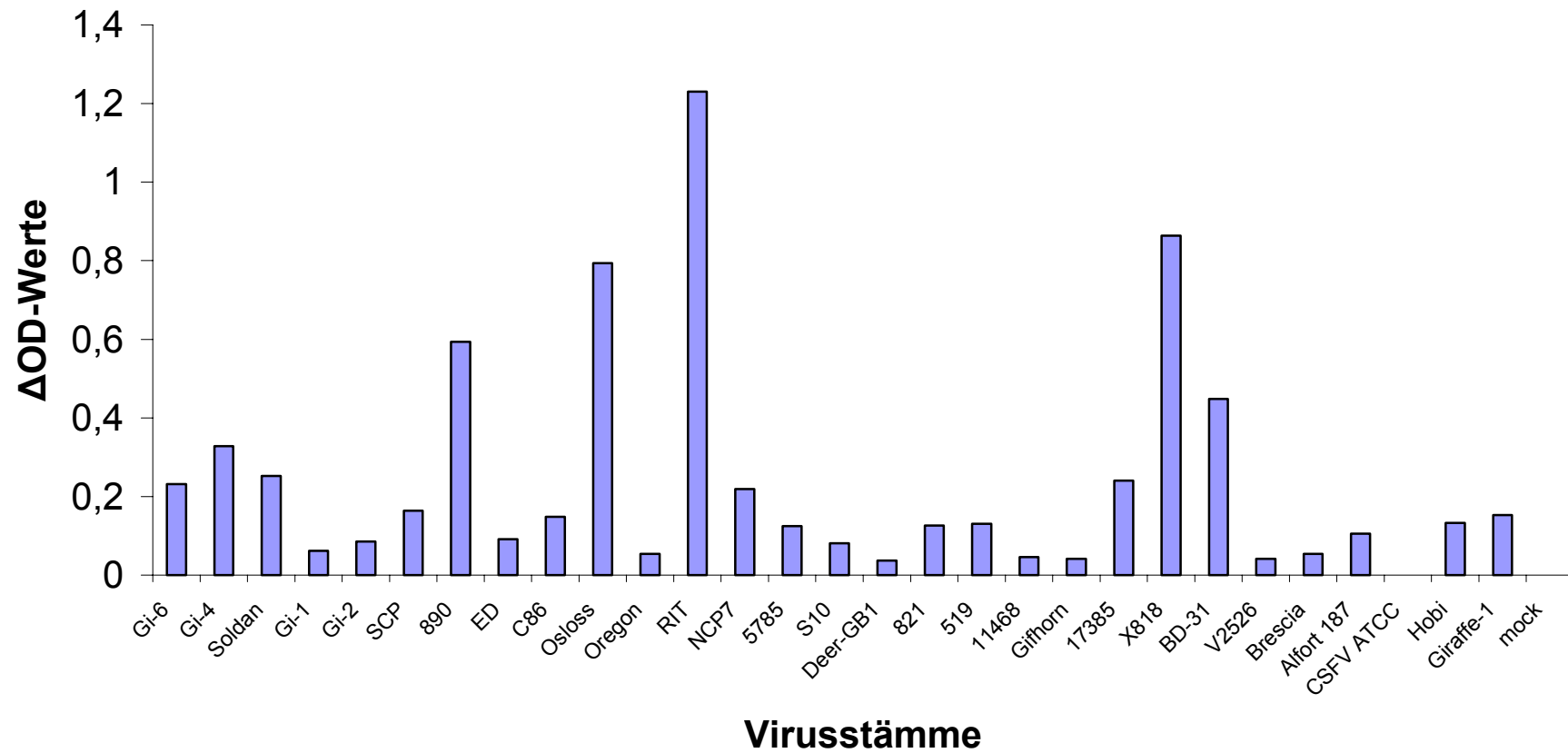


Abb. 36. Spezifität des Sandwich-ELISA (virushaltige Kulturüberstände): Die Spezifität des ELISA wurde unter Verwendung von Überständen infizierter Zelllinien getestet. Als Kontrolle wurden mock-infizierte MDBK-Zellen verwendet. $\Delta OD\text{-Werte} = OD_{\text{Testvirus}} - OD_{\text{mock}}$.

4. DISKUSSION

Infektionen durch Pestiviren verursachen nach verbreiteter Auffassung erhebliche wirtschaftliche Verluste in der Rinderhaltung. Aus diesem Grund wurden in zahlreichen Ländern Bekämpfungsprogramme zur Tilgung von BVDV initiiert, die z.T. bereits bemerkenswerte Erfolge aufweisen können. In Deutschland existiert bisher kein bundeseinheitliches Bekämpfungsprogramm. Die Teilnahme an Eradikationsprogrammen auf Ebene der Bundesländer ist bislang freiwillig. Vor dem Hintergrund möglicher Handelsbeschränkungen im Rahmen der EU ist jedoch zu erwarten, dass die Bekämpfung ruminanter Pestiviren in naher Zukunft mittels einer Bundesverordnung zentral geregelt wird. Eine wichtige Grundlage von Bekämpfungsprogrammen sind genaue Kenntnisse der Verbreitung der relevanten Erreger in der Rinderpopulation. Bisher wurden bei Rindern nur zwei Vertreter des Genus Pestivirus, nämlich BVDV-1 und BVDV-2 nachgewiesen. Beide Virusspezies zeichnen sich durch eine bemerkenswerte genetische und antigenetische Heterogenität aus, die Probleme bei der Labordiagnostik und bei der Wirksamkeit von Impfstoffen zur Folge haben können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die beiden vorgenannten Aspekte der Biologie von Pestiviren, die genetische und die antigenetische Heterogenität, bearbeitet werden. Im Vordergrund standen dabei die Unterscheidung zwischen BVDV-1 und BVDV-2 bei Virusisolaten von Rindern, die aus deutschen Betrieben gewonnen wurden sowie die nähere Charakterisierung von ausgewählten Feldisolaten. Die erhaltenen Erkenntnisse sollten u.a. zur Verbesserung labordiagnostischer Verfahren beitragen und etwaige Schwachpunkte aufzeigen. Die Untersuchung von Feldvirusisolaten, die im Rahmen der Routinediagnostik des Instituts für Virologie gewonnen wurden, sollte einen Überblick über die vorkommenden Pestivirusspezies und Subgruppen liefern.

Den ersten Schwerpunkt der Arbeit bildete die Etablierung von PCR-Verfahren, nämlich einer BVDV-2 diskriminierenden Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), einer BVDV-1 spezifischen RT-PCR sowie real time PCR Verfahren, um eine schnelle Unterscheidung von BVDV-1 und BVDV-2 zu ermöglichen. Die Ermittlung von Nukleinsäureteilsequenzen ausgewählter Isolate diente dabei zur Überprüfung der gewonnenen Ergebnisse.

Neben Virusisolaten aus der Routinediagnostik erfolgten auch Untersuchungen von Pestiviren aus Beständen, in denen seit längerem Impfungen gegen BVD/MD durchgeführt wurden. Hierbei stand die Frage im Vordergrund, ob der Einsatz zugelassener Vakzinen

auf der Basis von BVDV-1a und 1b das Auftreten von Vertretern anderer BVDV-1 Subgruppen und BVDV-2 begünstigt.

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit widmete sich der antigenetischen Heterogenität von Pestiviren. Durch die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen das rekombinant exprimierte E2 von BVDV-1 und BVDV-2 sollten Reagenzien gewonnen werden, die eine Unterscheidung der vorgenannten Pestiviruspezies auf der Basis antigenetischer Eigenschaften ermöglichen.

4.1. Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR hat sich in den vergangenen Jahren als eine der wichtigsten Methoden zum Nachweis von Pestiviren etabliert. Vorteile der RT-PCR sind die hohe Sensitivität, die Untersuchungen von Sammelproben zulässt und die hohe Spezifität, die eine Unterscheidung verschiedenener Pestiviren ermöglicht. Dabei lassen sich auch Probenmaterialien untersuchen, die aufgrund ihrer Eigenschaften (z.B. für Kulturzellen toxische Inhaltsstoffe) weder in der Zellkultur noch im ELISA einsetzbar sind. Die bisher etablierten RT-PCR Protokolle zum Nachweis pestiviraler RNS berücksichtigen verschiedene Genombereiche (u.a. 5' NTR, E2, NS3 und NS5) (Hyndman et al., 1998; Scheibner et al., 2000; Rossmann et al., 2001).

Die schnelle Zuordnung von Pestivirusisolaten zu einer etablierten Virusspezies ist u.a. bei der Unterscheidung zwischen KSPV und ruminanten Pestiviren (BVDV, BDV) wichtig; letztere infizieren auch Schweine, wobei ihr Nachweis bisher nicht zu tierseuchenrechtlichen Maßnahmen führt (Canal et al., 1996; Barlic-Maganja und Grom, 2001). Bei Rindern kann die Differenzierung der in der Population vorkommenden Pestiviren wichtige Grundlagen für die erfolgreiche Durchführung von BVDV/MD Bekämpfungsprogrammen liefern. Zur Unterscheidung ruminanter Pestiviren wurden bereits verschiedene RT-PCR Protokolle publiziert (Fulton et al., 1999; Ridpath und Bolin, 1998).

Die hohe Spezifität der RT-PCR birgt vor dem Hintergrund der genetischen Variabilität von Pestiviren die Gefahr, dass einzelne Virusisolate durch das Nachweisverfahren nicht erfasst werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Verfahren etabliert, das den Nachweis eines möglichst breiten Spektrums von Pestiviren mit der gleichzeitigen Unterscheidung zwischen BVDV-2 und anderen Vertretern des Genus verbinden sollte. Auf Grund der großen Menge verfügbarer Sequenzen aus der 5'

NTR wurde dieser Genombereich für die Entwicklung der RT-PCR herangezogen. Mit Hilfe der ausgewählten pan-Pestivirus spezifischen Primer gelang der Nachweis aller zur Verfügung stehenden Virusisolate. Die Identifizierung von BVDV-2 Isolaten erfolgte durch den gleichzeitigen Einsatz von BVDV-2 spezifischen Primern. Die Heterogenität der bekannten BVDV-2 Sequenzen im Bereich der 5' NTR machte dabei die Verwendung mehrerer Primer erforderlich. Alternativ wäre auch der Einsatz eines stark degenerierten Oligonukleotids möglich gewesen. Das etablierte Verfahren erlaubt somit den Nachweis von Pestiviren bei gleichzeitiger Identifizierung von BVDV-2. Da bei Rindern bisher nur Vertreter der Spezies BVDV-1 und BVDV-2 nachgewiesen wurden, ist im Fall eines positiven Pestivirusnachweises bei negativem Ergebnis für BVDV-2 eine Infektion mit BVDV-1 zu vermuten. Allerdings können Infektionen mit BVDV-1 und BVDV-2 bei einem Tier nicht erkannt werden. Zur Überprüfung der Ergebnisse der BVDV-2 diskriminierenden RT-PCR und zur Diagnose von Mehrfachinfektionen wurde zusätzlich eine BVDV-1 spezifische RT-PCR etabliert. Hierzu wurde der Bereich des N^{pro}-Gens herangezogen, der aufgrund intensiver Sequenzvergleiche als besonders geeignet erschien. Zur Ermittlung der Spezifität der etablierten RT-PCR standen durch Nukleinsäuresequenzanalysen charakterisierte Virusisolate aus 7 unterschiedlichen BVDV-1 Subgruppen zur Verfügung. Es gelang mit Hilfe der BVDV-1 spezifischen RT-PCR alle getesteten BVDV-1 Isolate nachzuweisen.

BVDV-2 Stämme wurden zuerst in den USA und in Kanada (Carman et al., 1998; Ridpath et al., 1994) isoliert, treten aber mittlerweile auch in anderen Regionen wie Asien (Nagai et al., 2001; Park et al., 2004; Sakoda et al., 1999), Mittelamerika und Südamerika (Becher et al., 1999b; Flores et al., 2000; Jones et al., 2001) auf. In Europa wurde BVDV-2 u.a. in Belgien (Couvreur et al., 2002; Letellier et al., 1999), Frankreich (Vilcek et al., 2001), Italien (Luzzago et al., 2001) und Deutschland nachgewiesen (Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b; Beer et al., 2002; Wolfmeyer et al., 1997). Der Anteil von BVDV-2 an den bei Rindern isolierten Pestiviren beträgt in den USA ca. 40-47% (Ridpath et al., 1994; Bolin und Ridpath, 1998; Ridpath et al., 2000). In Deutschland wurden BVDV-2 Infektionen mit ca. 11% seltener beobachtet (Wolfmeyer et al., 1997).

Durch Kombination der beiden etablierten RT-PCR Verfahren ließen sich 289 untersuchte Virusisolate boviner Herkunft eindeutig zuordnen. Die richtige Gruppierung wurde durch Sequenzanalysen an ausgewählten Virusisolaten bestätigt.

Die Untersuchung von 276 Pestiviren im Rahmen der vorliegenden Arbeit, die in den Jahren 1996 bis 2002 aus Rinderbeständen in Deutschland isoliert wurden, ergab einen BVDV-2 Anteil von 21%. Da aus einigen betroffenen Beständen, insbesondere mit BVDV-2 Nachweis, mehrfach Pestiviren isoliert wurden, gibt diese Zahl nicht die tatsächliche Verbreitung von BVDV-2 in der deutschen Rinderpopulation wieder. Ein genaueres Bild wurde durch die Gliederung der Ergebnisse nach Beständen erreicht. Danach konnte in 14.3% der untersuchten Betriebe BVDV-2 nachgewiesen werden. In 3.2% der Bestände waren sowohl BVDV-1 als auch BVDV-2 vertreten. Ob die ermittelten Werte auf eine Zunahme von BVDV-2 Infektionen hindeuten, z.B. als Folge verstärkter Impfungen mit BVDV-1, ist unklar.

Lediglich ein Virusisolat aus einer kontaminierten equinen Zelllinie (ED-Zellen) wurde durch die BVDV-2 diskriminierende RT-PCR nicht richtig eingestuft (Pestivirus-positiv, BVDV-2 negativ). Anhand von Sequenzanalysen konnte das Virus in der Folge eindeutig als BVDV-2 klassifiziert werden. Die Herkunft des Virus ist unbekannt. Ein Ursprung aus kontaminiertem foetalem Rinderserum ist wahrscheinlich.

Neben Virusisolaten von Rindern wurden auch zwei Pestivirusisolate aus Schafen sowie ein Pestivirus aus einer Antilope untersucht. Während sich das Antilopen-Virus eindeutig als BVDV-1 einstufen ließ, ergab die Untersuchung der Isolate aus Schafen kein eindeutiges Ergebnis (Pestivirus-positiv, BVDV-1 und BVDV-2 negativ). Die beiden letztgenannten Virusisolate konnten nach Ermittlung der für das N^{pro} kodierenden Genomsequenz als Vertreter von BDV-2 eingruppiert werden (Becher et al., 2003).

Ein neueres Verfahren, dass auch zum Nachweis von Pestiviren eingesetzt wird, ist die real time RT-PCR. Hierbei erfolgt der Nachweis von Amplifikationsprodukten in Echtzeit mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (Higuchi et al., 1993; Wittwer et al., 1997). Vorteile der real time PCR insbesondere im Hinblick auf diagnostische Anwendungen sind u.a eine im Vergleich zur konventionellen PCR gesteigerte Sensitivität und die Vermeidung von Kontaminationen durch den Verzicht auf post-PCR Schritte wie z.B. die Gelelektrophorese. Im Rahmen der Arbeit wurde ein Verfahren etabliert, welches wiederum den sensitiven Nachweis möglichst aller bekannten Pestivirusisolate mit der gleichzeitigen Unterscheidung zwischen BVDV-1 und BVDV-2 verbinden sollte. Zu diesem Zweck wurden pan-Pestivirus spezifische Primer ausgewählt, die unter Verwendung des Fluorochroms SYBR[®]Green alle 26 getesteten Pestivirusisolate erkannten. Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR[®]Green haben den Nachteil, dass sie unspezifisch an amplifizierte DNS binden und so auch unerwünschte Produkte wie z.B.

Primerdimere nachweisen. Das Auftreten von Primerdimeren und nicht-spezifischen Amplifikationsprodukten wurde bei der etablierten real time PCR mit Hilfe einer Schmelzpunktanalyse der Amplifikate ausgeschlossen. Eine weitere Unterscheidung von Virusisolaten ist mit dem beschriebenen Verfahren nicht möglich. Daher wurden zwei Sonden mit unterschiedlicher Spezifität ausgewählt, die innerhalb des von den Primern flankierten Genomfragments binden. Die Markierung der Sonden mit zwei unterschiedlichen Fluorochromen sollte die Unterscheidung von BVDV-1 und BVDV-2 im Rahmen einer multiplex real time TaqMan[®] RT-PCR ermöglichen. Bei der Auswahl der Sonden ergaben sich erhebliche Schwierigkeiten durch die genetische Variabilität von Pestiviren im ausgewählten Genombereich (5' NTR). So gelang es nicht, Sonden mit eindeutiger Spezifität für BVDV-1 bzw. BVDV-2 zu generieren. Die Sonde PV-Taq01 erkannte alle getesteten BVDV-1 Isolate sowie Vertreter von BDV-1, BDV-2 und BDV-3. Unter Verwendung der Sonde PV-Taq02 gelang nicht nur der Nachweis aller vorher nachgewiesenen BVDV-2 Isolate, sondern auch des mit Hilfe der konventionellen RT-PCR nicht richtig klassifizierten Isolats ED. Darüberhinaus wurden Vertreter von BDV-1, BDV-2 und BDV-3, die Isolate Giraffe-1 und Hobi sowie einige BVDV-1 Isolate erkannt. Eine eindeutige Unterscheidung von Pestivirusisolaten ist unter Verwendung der beiden Sonden (PV-Taq01 und PV-Taq02) somit nicht möglich. Die Kombination der beiden Sonden erlaubt dennoch eine Diskriminierung von BVDV-1 und BVDV-2 bei Pestivirusisolaten aus Rindern.

Eine Verbesserung der Spezifität der real time RT-PCR lässt sich durch den Einsatz kürzerer TaqMan[®] Sonden erreichen. Die Mindestlänge konventioneller TaqMan[®] Sonden ist durch die notwendige hohe Schmelztemperatur von rund 70°C vorgegeben. Kürzere Sonden lassen sich auf Basis der MGB-Technologie etablieren. Hierbei sind die fluorochrommarkierten Oligonukleotide zusätzlich mit DNS bindenden Substanzen gekoppelt ("minor groove binder"), welche die Hybridisierung der Sonden an die Ziel-DNS stabilisieren. Tatsächlich gelang durch Einsatz von TaqMan[®] MGB-Sonden in Verbindung mit den Primern PV-03R und PV-02 eine eindeutige Diskriminierung zwischen den in dieser Arbeit untersuchten BVDV-1 und BVDV-2 Isolaten (Daten nicht gezeigt).

4.2. Heterogenität ruminanter Pestiviren

Ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung von Pestiviren ist ihre genetische Verwandtschaft, die sich anhand phylogenetischer Analysen ermitteln lässt. Solche

Analysen können auf Basis der vollständigen Nukleinsäuresequenzen (komplette Virusgenome) oder unter Verwendung von Teilsequenzen erstellt werden. Die Bestimmung kompletter Virusgenome ist mit erheblichem Aufwand und Kosten verbunden, daher basieren phylogenetische Analysen meist auf dem Vergleich von Teilsequenzen. Hierzu wurden häufig kleine Sequenzabschnitte insbesondere aus der 5' NTR (weniger als 250 Nukleotide) verwendet, die sich einfach und schnell bestimmen lassen; (Baule et al., 1997; Beer et al., 2002; Flores et al., 2002; Jones et al., 2001; Luzzago et al., 2001; Nagai et al., 2001; Paton et al., 1995; Ridpath et al., 2000;; Vilcek et al., 1994; Vilcek et al., 1997). Allerdings ist dieser Genombereich für eine statistisch signifikante Einteilung von Pestiviren in Subgruppen nur eingeschränkt geeignet (Becher et al., 1997; Becher et al., 1999b). Einerseits repräsentiert der vorgenannte Sequenzabschnitt nur ca. 2% des gesamten Genoms, andererseits weisen die Genomsequenzen verschiedener Pestivirusisolate in diesem Bereich unterschiedliche Längen auf, so dass eine vergleichende Analyse erheblich erschwert wird (Avalos-Ramirez, 2002). Für eine statistisch signifikante genetische Unterteilung von Pestiviren in Spezies und Subgruppen sind größere Abschnitte aus dem kodierenden Bereich des Genoms besser geeignet. So wurde durch Analysen auf der Grundlage kompletter Genomsequenzen des N^{pro}-Gens und des E2-Gens eine statistisch signifikante Unterteilung von Pestiviren in Subgruppen innerhalb der Virusspezies erreicht (Avalos-Ramirez et al., 2001; Avalos-Ramirez, 2002; Becher et al., 1997; Becher et al. 1999b; Wolfmeyer et al., 1997).

Phylogenetische Analysen von Sequenzen ruminanter Pestiviren wurden in dieser Arbeit auf Basis der kompletten N^{pro}- und E2-Gene durchgeführt und mit den Ergebnissen anderer Studien verglichen. Die untersuchten Isolate ließen sich unter Berücksichtigung der genetischen Distanzen sowie der Topologie des phylogenetischen Baumes den Spezies BVDV-1, BVDV-2 und BDV (BDV-2) sowie zahlreichen genetischen Subgruppen zuordnen. Zwei Isolate (Hobi und Antelope-Pronghorn) konnten keiner bekannten Spezies zugeordnet werden. Beide Virusisolate wurden bereits als Vertreter möglicher neuer Virusspezies innerhalb des Genus *Pestivirus* vorgeschlagen (Schirrmeier 2002; Vilcek et al., 2001).

Die genetische Heterogenität von BVDV-1 Isolaten wurde bereits intensiv untersucht und führte zur Beschreibung von bis zu 11 Subgruppen innerhalb dieser Virusspezies (Vilcek et al., 2001). In der letztgenannten Arbeit erfolgte die Unterteilung auf der Basis der 5' NTR und des N^{pro}-Gens. Dabei wurde eine der 11 Subgruppen (BVDV-1j) nur auf der Basis

bereits 1997 publizierter Sequenzen aus der 5' NTR etabliert (Baule et al., 1997). Nach eigenen Vergleichen der 5' NTR Sequenzen der Isolate aus dieser Gruppe (M079B/91, M065B/93, S-ALT5K) und des Isolates Deer-GB1 wurde nur ein Nukleotidunterschied zwischen den Sequenzen gefunden (Daten nicht gezeigt). Die betreffenden Isolate lassen sich auf der Basis der 5' NTR zusammen mit Deer GB-1 in eine Subgruppe (BVDV-1e) einordnen, wodurch sich die Zahl der bekannten BVDV-1 Subgruppen auf 10 reduziert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzuntersuchungen auf der Basis des gesamten N^{pro}-Gens führten bei BVDV-1 ebenfalls zu einer Unterteilung in 10 Subgruppen.

Phylogenetische Untersuchungen u.a aus USA, England, Deutschland, Irland, Spanien, Argentinien, Japan und Korea haben gezeigt, dass Viren aus den Subgruppen BVDV-1a und -1b in den genannten Ländern am häufigsten vorkommen (Arias et al., 2003; Bolin, 1998; Jones et al., 2001; Nagai et al., 2001; Park et al., 2004; Ridpath und Graham et al., 2001; Tajima et al., 2001; Vilcek et al., 2001). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Viren aus anderen Subgruppen ebenfalls häufig auftreten, z.B. in Deutschland BVDV-1d, c, g und f, in Frankreich BVDV-1"e" und d, in Italien BVDV-1c, d und f, in Österreich BVDV-1f, g, h und d, in der Slowakei BVDV-1h, f und d, in Spanien BVDV-1c und h, in Ungarn BVDV-1f sowie im Vereinigten Königreich BVDV-1i (Arias et al., 2003; Becher et al., 1999b; Luzzago et al., 2001; Tajima et al., 2001; Vilcek et al., 2001; Vilcek et al., 2003a; Vilcek et al., 2003b).

Die von uns untersuchten BVDV-1 Isolate aus Deutschland ließen sich fünf verschiedenen Subgruppen zuordnen (1a, 1b, 1c, 1d und 1f). Besonders häufig vertreten war die Subgruppe 1b gefolgt von 1d. Eine ähnliche Verteilung wurde von Tajima für BVDV-1 Isolate aus Niedersachsen beobachten (Tajima et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Isolate aus England wurden als BVDV-1a charakterisiert; diese Pestivirussubgruppe kommt im Vereinigten Königreich am häufigsten vor (Vilcek et al., 1999). Pestivirus-Isolate aus Rindern und kontaminiertem Serum aus Frankreich wurden als Vertreter der Subgruppen BVDV-1b und "e" (von Vilcek als Subgruppe 1e bezeichnet s.u.) klassifiziert, die in Frankreich ebenfalls häufig auftritt (Vilcek et al., 2001)(Abb. 14). Aus einem argentinischen Serum wurde das Pestivirus S10 isoliert, das von uns als BVDV-1 "e" klassifiziert wurde. Die Bezeichnung "e" wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Berücksichtigung der uneinheitlichen Nomenklatur von BVDV-1 Subgruppen in der Literatur gewählt. So hatten Becher et al. bereits 1999 fünf Subgruppen beschrieben und als BVDV-1 a bis e benannt (Becher et al. 1999b). Die Subgruppe e umfasste dabei nur das

Isolat BVDV-1 Deer-GB1. In der Arbeit von Vilcek et al. aus dem Jahr 2001 wurde diese Nomenklatur nur zum Teil übernommen und ergänzt (Vilcek et al., 2001). So entstand eine neue Subgruppe BVDV-1e, während das Isolat BVDV-1 Deer-GB1 keiner Subgruppe zugeordnet wurde. Um eine Vereinheitlichung ohne umfassende Neubenennung der Subgruppen zu erreichen, wurde die Nomenklatur von Becher et al. beibehalten und die Subgruppe BVDV-1e nach Vilcek et al. als BVDV-1"e" gekennzeichnet; die Zuordnung der Subgruppen BVDV-1f bis i blieb hierdurch unverändert.

Für die Virusspezies BVDV-2 wurden bisher 2 Subgruppen (BVDV-2a und b) vorgeschlagen (Becher et al., 1999b; Flores et al., 2002). In Deutschland, Korea, Japan, den USA, Kanada, Frankreich und Italien kommen besonders häufig Vertreter von BVDV-2a vor (Becher et al., 1999b; Giangaspero et al., 2001; Park et al., 2004; Ridpath und Bolin, 1998; Ridpath et al., 1994; Ridpath et al., 2000; Shimazaki et al., 1998; Tajima et al., 2001). Die Subgruppe BVDV-2b umfasst Isolate aus Mittel- und Südamerika (Becher et al., 1999b; Flores et al., 2000; Jones et al., 2001; Flores et al., 2002). Ein Isolat (28508-5), das von Flores et al. als BVDV-2b klassifiziert wurde (Flores et al., 2002), stellt nach unseren phylogenetischen Analysen auf Basis des N^{pro}- und E2-Gens den bislang einzigen Vertreter einer neuen Subgruppe (BVDV-2c) dar (s. Abb. 14 und 15).

Alle bisher in Deutschland isolierten Mitglieder der Spezies BVDV-2 gehören zur Subgruppe 2a und sind eng miteinander verwandt (Abb. 14). In einer Studie aus dem Jahr 2002 wurden BVDV-2-Isolate aus Deutschland auf Basis der 5' NTR klassifiziert und eine Aufteilung der Isolate in drei Subgruppen vorgeschlagen (Beer et al., 2002). Nach eigenen Untersuchungen, unter Einbeziehung von Sequenzen der Subgruppen BVDV-2a, b und c, lassen sich die von Beer et al. untersuchten Isolate (s.o.) alle der Subgruppe 2a zuordnen (Daten nicht gezeigt).

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagene Unterteilung der Spezies BVDV-2 wurde durch die Eingruppierung des Isolates Soldan aus Brasilien bestätigt. Soldan gehört zusammen mit den Isolaten Gi-4, Gi-5, Gi-6 und Gi-7 (Ursprung Mittelamerika) zur Subgruppe BVDV-2b (Canal et al., 1998; Becher et al., 1999b; Flores et al., 2002). Ein weiteres Isolat aus Paraguay (kontaminiertes Serum) wurde ebenfalls als BVDV-2b eingruppiert (Daten nicht gezeigt). Demnach stammen alle bisher untersuchten Mitglieder der Subgruppe BVDV-2b aus Mittel- und Südamerika.

Die Schaf-Isolate AZ79 und 17358 wurden zusammen mit den Isolaten Reindeer-1 und Bison als BDV-2 eingruppiert. Diese Gruppe wurde von Avalos-Ramirez et al. und Becher

et al. als eine neue Spezies oder Subgruppe von BDV vorgeschlagen und den klassischen BDV Isolaten (BDV-1) gegenübergestellt (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 2003). Eine dritte BDV-Subgruppe (BDV-3) wurde ebenfalls von Becher et al. vorgeschlagen (Avalos-Ramirez et al., 2001; Becher et al., 2003).

Ein wichtiges Kriterium für die phylogenetische Gruppierung von Pestiviren stellen, wie bereits erwähnt, genetische Distanzen dar, die sich anhand paarweiser Sequenzvergleiche bestimmen lassen. Durch die Untersuchung der Häufigkeitsverteilung der berechneten genetischen Distanzen lässt sich eine Aussage über die Signifikanz der Einteilung von Pestiviren in Subgruppen unterhalb der Speziesebene treffen. Hierzu wurden die genetischen Distanzen von mehr als 170 Pestivirusisolaten für den Bereich des N^{pro}-Gens ermittelt. Die daraus erstellte Häufigkeitsverteilung weist drei separate Maxima auf, welche die phylogenetischen Cluster Isolat, Subgruppe und Spezies repräsentieren.

4.3. Gewinnung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen das Glykoprotein E2 von Pestiviren

Der zweite Schwerpunkt der Dissertation widmete sich der Gewinnung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Pestiviren. Ziel dieses Projektes war es, Reagenzien zu gewinnen, die eine schnelle Unterscheidung von BVDV-1 und BVDV-2 auf der Basis antigenetischer Eigenschaften von Virusisolaten erlauben. Weiterhin sollte eine Grundlage für einen Test gelegt werden, der in Ergänzung zum Serumneutralisationstest eine Unterscheidung von Antikörpertitern nach Infektion mit BVDV-1 bzw. BVDV-2 erlaubt. Hierzu wurden Antikörper gegen das im Baculovirussystem exprimierte virale Hüllglykoprotein E2 von BVDV-1 sowie BVDV-2 hergestellt. Das Baculovirusexpressionssystem wurde ausgewählt, da in diesem System posttranslationale Modifikationen (Glykosylierung u.a.) ähnlich wie in Säugerzellen erfolgen und sich große Mengen rekombinanter Proteine gewinnen lassen (O'Reilly, 1994). Neben zwei kompletten E2-Glykoproteinen (BVDV-1 CP7, BVDV-2a 890), die sich aus dem Zellextrakt infizierter Insektenzellen reinigen ließen, wurde auch ein C-terminal verkürztes rE2 von BVDV-Gi-1 (ohne Membrananker) verwendet, welches aus dem Überstand infizierter Insektenzellen gewonnen werden konnte. Die drei rE2 wurden erfolgreich mittels Immunaффinitätschromatographie gereinigt und zur Gewinnung sowie Charakterisierung von mAk verwendet. Das gereinigte rE2 von BVDV-1 CP7 zeigte im Immunoblot unter

nicht reduzierenden Bedingungen neben den beiden erwarteten Banden (E2 Monomer und E2 Homodimer) eine weitere Bande in der Grösse von ca. 70-75 kDa. Es ist unklar, ob es sich bei diesem Protein um ein proteolytisches Degradationsprodukt des rE2 Homodimer oder ein Heterodimer zwischen rE2 und einem unbekannten zellulären Protein handelt. Die Mitaufräumung zellulärer Antigene in Form von Heterodimeren mit pestiviralen Proteinen würde auch eine Erklärung für die Entstehung zahlreicher Zellklone mit Spezifität für zelluläre Antigene im Rahmen der Fusionen liefern.

Insgesamt wurden sieben mAk gegen rE2 von CP7 und 890 gewonnen (Tab. 12), die eine positive Reaktion mit den zur Immunisierung verwendeten Antigenen im Immunoblot unter nicht reduzierenden Bedingungen und, mit Ausnahme von zwei mAk (SCR78 und SCR4), auch unter reduzierenden Bedingungen zeigten. Hieraus wurde geschlossen, dass fünf mAks gegen kontinuierliche Epitope gerichtet sind, während die letztgenannten mAk diskontinuierliche (konformationelle) Epitope erkennen.

Das Reaktionsspektrum der gewonnenen mAk wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung einer Vielzahl von Pestivirusisolaten (Laborstämme, Impfvirusstämme und Feldvirusisolate) getestet. Alle mAk erkannten ausschließlich ruminante Pestiviren und nicht den KSPV Stamm Alfort 187. Die beobachteten Reaktionsmuster zeigten, dass die gewonnenen mAk gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind.

Bemerkenswert war die breite Reaktivität einiger mAk aus der ersten Fusion gegen rE2 von BVDV-1 CP7 mit Vertretern der unterschiedlichen Spezies ruminanter Pestiviren. Offenbar existieren immundominante Epitope im E2, die zwischen ruminanten Pestiviren konserviert sind.

Auffallend waren auch Unterschiede in der Intensität der Immunfluoreszenz beim Vergleich verschiedener Virusstämme. So wurden bei einigen Virusisolaten nur wenige infizierte Zellen angefärbt, die vermutlich eine besonders große Menge E2 enthielten. Möglicherweise zeigen die mAk unterschiedliche Affinitäten zu E2 von verschiedener Virusstämmen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in anderen Untersuchungen gemacht (Deregt et al., 1998). Ein Isolat (BVDV-2 ED) wurde von keinem der gewonnenen mAk erkannt, obwohl verwandte BVDV-2 Isolate mit mehreren mAks reagierten. Über den Ursprung des Isolats, dass bei der Untersuchung einer equinen Zelllinie entdeckt wurde, liegen keine weiteren Erkenntnisse vor. Wahrscheinlich ist eine Infektion der Zellen im Verlauf der Kultivierung durch kontaminiertes Rinderserum, da aus Equiden bisher keine Pestiviren isoliert wurden. Ein Zusammenhang mit einer

Adaptation des Virus an die Vermehrung in equinen Zellen und einen damit verbundenen Verlust der durch die mAk erkannten Epitope ist denkbar. Die Bestimmung der für das E2 kodierenden Sequenz des betreffenden Isolates könnte hier weiteren Aufschluß bringen.

Die gewünschte eindeutige Unterscheidung zwischen BVDV-1 und BVDV-2 anhand der in der Arbeit hergestellten mAk wurde nur partiell erreicht. So erkennt der mAk SCR4 BVDV-2a Isolate (außer ED), nicht jedoch BVDV-1 und BVDV-2b. Im Gegenzug reagiert der mAk SCR48 mit der Mehrzahl der BVDV-1 und BVDV-2b Isolate, nicht jedoch mit Vertretern von BVDV-2a.

Ein wichtiges Ziel des zweiten Teils der Arbeit war der Aufbau von ELISA-Systemen zum Nachweis von Pestiviren und zur Unterscheidung von BVDV-1 und BVDV-2. Die diesbezüglichen Versuche konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abgeschlossen werden. Vorversuche hatten gezeigt, dass sich die mAk SCR60 und SCR25 für den Einsatz in einem Sandwich ELISA eignen. Aus diesem Grund wurden die beiden Antikörper für die Etablierung eines ELISA eingesetzt, der zum Nachweis verschiedener Pestivirusstämme in Zellextrakten verwendet wurde. Das im ELISA beobachtete Reaktionsspektrum entsprach den Erwartungen aus den Experimenten mittels Immunfluoreszenz. Allerdings wurde nur ein reduziertes Spektrum von Virusstämmen getestet. Die Verwendung von Kulturüberständen infizierter Zelllinien brachte nicht die gewünschten Ergebnisse. Nur einige der Virusisolate wurden erkannt. Die Ursachen hierfür sind nicht geklärt. Die Kulturüberstände waren für das vorliegende Experiment nicht titriert worden. Eine Wiederholung des ELISA mit Überständen, die eine definierte Menge an infektiösen Virionen bzw. viralen Proteinen enthalten, kann hier weiteren Aufschluss bringen.

Weitere Versuche unter Verwendung der neu gewonnenen Antikörper zur Etablierung und Verbesserung eines ELISAs sind geplant. Leider ließ sich der gegen ein konformationelles Epitop von BVDV-2 gerichtete mAk SCR4 bisher nicht erfolgreich im ELISA einsetzen. Somit konnte nicht wie geplant ein Schnelltest zur begrenzten Unterscheidung zwischen BVDV-1 und BVDV-2a Isolaten etabliert werden.

Neben einem System zum diagnostischen Nachweis von Pestiviren sollte auch ein ELISA zur Quantifizierung von E2, z.B. in Impfstoffpräparationen, etabliert werden. Auch in dieser Richtung konnten nur vorläufige Experimente durchgeführt werden. So gelang der quantitative Nachweis von rE2 über einen Bereich von 5 bis 7 log₂ Verdünnungsstufen.

Die Empfindlichkeit des ELISA lag bei 2–16 ng bezogen auf das eingesetzte Protein. Allerdings muss hierbei die Reinheit des eingesetzten rE2 beachtet werden, die nur geschätzt werden konnte.

Bei der Quantifizierung von E2, z.B. in Impfstoffen, ist die Auswahl des geeigneten Standards von entscheidender Bedeutung. Beim Vergleich der Reaktionsstärke zwischen in Insektenzellen hergestelltem rE2 und rE2 aus Säugerzellen wurde beobachtet, dass das rekombinante Protein aus Mammalierzellen von den gewonnenen mAk erheblich schlechter erkannt wurde (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Ursache hierfür sind Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation von Glykoproteinen zwischen Insektenzellen und Mammalierzellen; insbesondere die Glykosilierung des E2 könnte hierbei eine Rolle spielen.

Neben einem Einsatz der gewonnenen mAks im Rahmen von ELISAs wurden weitere Einsatzgebiete untersucht. So eignen sich etwa mAk, welche die Infektiosität von Viren neutralisieren können, grundsätzlich zur funktionellen Charakterisierung der von ihnen erkannten Epitope. Daher wurden drei breit reagierende mAk ausgewählt und im Neutralisationstest (NT) gegen BVDV-1b und BVDV-2a getestet. Die mAk SCR25 und SCR60 waren in der Lage beide Testviren zu neutralisieren, während der mAk SCR4 keine nachweisbare Neutralisation induzierte. Interessant war das Ergebnis mit dem mAk SCR95, der im NT nur das BVDV-2 Testvirus, nicht aber das BVDV-1 Testvirus neutralisierte. Die Ursache für das erhaltene Ergebnis ist unklar, insbesondere, da der mAk das eingesetzte BVDV-1 Isolat in der indirekten Immunfluoreszenz eindeutig erkannte. Eine Wiederholung des beschriebenen Experiments brachte das gleiche Ergebnis. Weitere Tests unter Einschluss des homologen Virusstammes BVDV-1 CP7 ließen sich im Rahmen der Arbeit aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von gereinigtem mAk SCR95 nicht realisieren.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit von Antikörpern ist die Markierung von Viruspartikeln für elektronenmikroskopische Untersuchungen. Pestiviren sind aufgrund ihrer wenig charakteristischen Morphologie elektronenmikroskopisch nur schwer nachweisbar. Der Einsatz von mAk gegen das auf der Oberfläche von Virionen exponierte E2 kann hier Abhilfe schaffen. Für die Oberflächenmarkierung der Pestivirionen mit den gewonnenen mAk wurden zunächst Virionen (BVDV-1 NADL) gereinigt. Der Nachweis des E2-Glykoproteins auf der Oberfläche von Virionen gelang nur unter Verwendung des mAk

SCR60. Möglicherweise ist das Epitop, das von einem weiteren getesteten mAk (SCR8) erkannt wurde, an der Oberfläche von Virionen nicht zugänglich. Der fehlende immunelektronenmikroskopische Nachweis des E2 durch die beiden ebenfalls zur Oberflächenmarkierung von Pestivirionen eingesetzten mAk SCR25 und SCR95 kann nicht durch eine mangelnde Zugänglichkeit der Epitope erklärt werden, da beide mAk neutralisierende Eigenschaften aufweisen. Möglicherweise spielt hier eine besondere Empfindlichkeit der betreffenden Epitope gegenüber Einflüssen durch die Präparation von Virionen eine Rolle.

Die Heterogenität von Pestiviren hat wichtige Auswirkungen auf die Labordiagnostik und die Entwicklung von Impfstoffen (König et al., 2003). Beim Einsatz von modernen Diagnoseverfahren mit hoher Spezifität ist sicher zu stellen, dass alle vorkommenden Pestiviren erfasst werden. Dies gilt insbesondere bei der Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide für die Detektion viraler RNS mit Hilfe der RT-PCR oder real time PCR und der Verwendung monoklonaler Antikörper bei serologischen Diagnoseverfahren. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte u.a. ein Beitrag zur Verbesserung der Sicherheit labordiagnostischer Verfahren geleistet werden.

In diesem Zusammenhang wurden auf der einen Seite Verfahren zum Nachweis und zur Diskriminierung von Pestiviren erarbeitet und validiert. Dabei sollte durch vorausgehende umfassende Sequenzvergleiche sichergestellt werden, dass die etablierten PCR-Nachweise das komplette Spektrum der bekannten Virusisolate abdecken. Die theoretischen Vorhersagen über das Reaktionsspektrum der Primer und in eingeschränkter Weise auch der TaqMan®-Sonden wurde experimentell bestätigt. Damit stehen Verfahren zur Verfügung, welche sich grundsätzlich zur Überwachung von Rinderbeständen im Zusammenhang mit Bekämpfungsprogrammen eignen.

Auf der anderen Seite wurden Untersuchungen über die Verbreitung unterschiedlicher Pestiviren in der Rinderpopulation durchgeführt. Die Studien zur Phylogenie insbesondere der in Deutschland vorkommenden Pestiviren bilden eine wichtige Grundlage zum Verständnis der molekularen Epidemiologie von Pestiviren und damit eine Basis für die Diagnostik und für Bekämpfungsverfahren.

Die Etablierung von Verfahren zur Identifizierung und zur Differenzierung von Pestiviren auf der Basis des E2-Antigennachweises gelang bisher nur mit Einschränkungen.

Allerdings ermöglichen die neu gewonnenen Reagenzien die Durchführung zukünftiger Versuche zur Etablierung und Optimierung solcher Nachweisverfahren.

5.1. ZUSAMMENFASSUNG

Innerhalb der Familie *Flaviviridae* umfasst das Genus *Pestivirus* das Virus der bovinen Virusdiarrhö (BVDV-1 und 2), das Virus der klassischen Schweinepest (KSPV) und das Border Disease Virus der Schafe (BDV). Pestiviren infizieren Schweine, Wild- und Hauswiederkäuer und werden weltweit als Erreger ökonomisch bedeutender Infektionskrankheiten von Nutztieren betrachtet. Die genetische und antigenetische Variabilität innerhalb des Genus *Pestivirus* lässt die Unterteilung der Pestivirusspezies in Subgruppen zu. In dieser Arbeit wurden 293 Isolate ruminanter Pestiviren, die zwischen 1996 und 2002 isoliert wurden, mittels diskriminierender RT-PCR und real time RT-PCR untersucht. Primer wurden in der 5' nicht-translatierten Region (5' NTR) des Pestivirusgenoms und im Bereich des N^{pro}-Gens etabliert, da für diese Genombereiche bereits zahlreiche Sequenzdaten publiziert wurden. 218 bovine Isolate (78%) aus 127 Beständen (82.5%) aus Deutschland waren BVDV-1 positiv, während 58 bovine Isolate (21%) aus 22 Beständen (14.3%) als BVDV-2 infiziert eingestuft wurden. In 5 Beständen (3.2%) ließen sich BVDV-1 und BVDV-2 nachweisen. 9 bovine Isolate aus England und Frankreich, ein Isolat aus einer Antilope sowie 3 Isolate aus kontaminierten Zelllinien bzw. Seren wurden mittels RT-PCR ebenfalls als BVDV-1 klassifiziert, ein Rinderisolat aus Brasilien als BVDV-2. Ein Isolat (ED) aus einer kontaminierten Zelllinie wurde nur mittels real time RT-PCR als BVDV-2 eingestuft. Von 37 bestimmten N^{pro}-Sequenzen wurden 15 Isolate aus Deutschland den Subgruppen BVDV-1a, b, d und f zugeordnet; 6 bovine Isolate aus Deutschland wurden als BVDV-2a klassifiziert; das Isolat aus Brasilien (s.o.) als BVDV-2b. Zwei Isolate aus Schafen wurden als Vertreter einer möglichen neuen Spezies oder Subgruppe von BDV (BDV-2) charakterisiert, die Isolate Antelope-Pronhorn und Hobi als mögliche neue Spezies innerhalb des Genus *Pestivirus*.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit monoklonale Antikörper gegen das E2 Protein von BVDV nach Immunisierung mit rekombinantem E2 der Stämme BVDV-1 CP7 und BVDV-2 890 gewonnen. Die 7 monoklonalen Antikörper erkannten in verschiedenen Testsystemen nur ruminante Pestiviren. Die gewonnenen mAk wurden mittels Immunfluoreszenz, Immunoblot, Neutralisationstest und Immunelektronenmikroskopie charakterisiert. Mit Hilfe der neu gewonnenen Antikörper wurde ein ELISA zum Nachweis von E2 aus Zellextrakten aufgebaut und optimiert. Weitere Versuche zur Etablierung eines Nachweissystems auch aus Untersuchungsmaterial und zur Quantifizierung von E2 z.B. in Impfstoffpräparationen werden durch die neue hergestellte Reagenzien ermöglicht.

5.2. Abstract

The genus *Pestivirus* within the family *Flaviviridae* comprises bovine viral diarrhea virus (BVDV-1 and 2), classical swine fever virus (CSFV) and border disease virus (BDV) of sheep. Pestiviruses affect swine and wild as well as domestic ruminants and have a significant economical impact on farming worldwide. The genetic and antigenic variability between members of the genus *Pestivirus* enables subdivision of virus species into subtypes. In this work we examined 293 isolates of ruminant pestiviruses collected between 1996 and 2002 by discriminating RT-PCR and real time RT-PCR. Primers were selected from the 5' nontranslated region (NTR) and N-terminal protease (N^{pro}) coding sequence because of the large number of accessible sequences from these two areas of the genome. 218 (78%) bovine isolates from 127 (82.5%) herds from Germany were BVDV-1 positive whereas BVDV-2 was found in 58 (21%) samples from 22 (14.3%) herds. In 5 (3.2%) herds BVDV-1 as well as BVDV-2 was detected by RT-PCR. 9 bovine isolates from England and France, 1 isolate from an antelope as well as 3 virus isolates from contaminated cell cultures or fetal bovine serum were classified as BVDV-1 and a bovine isolate from Brasil as BVDV-2. One isolate from a contaminated cell line (ED) was shown to represent BVDV-2 only by real time RT-PCR. The nucleotide sequences encoding N^{pro} were determined from 37 virus isolates: 15 bovine isolates from Germany were grouped as BVDV-1a, b, d and f, 6 additional bovine isolates as BVDV-2a. The virus isolate from Brasil (see above) was designated BVDV-2b. Two isolates from sheep were characterized as members of a tentative new species or subgroup of BDV (BDV-2), isolates Antelope-Pronhorn and Hobi as tentative new species within the genus *Pestivirus*.

In addition monoclonal antibodies (mAbs) were generated against the E2 protein of BVDV after immunization with recombinant E2 from virus strains BVDV-1 CP7 and BVDV-2 890. In different test systems all 7 mAbs recognized only ruminant pestiviruses. The mAbs were tested by immunofluorescence, immunoblot, neutralization assays and immune electron microscopy. Using the mAbs an ELISA was established for the detection of E2 from cell extracts. Experiments can now be performed to establish an assay for detection of E2 in diagnostic samples and for quantification of E2 e.g. in vaccine preparations.

- Arias, P., Orlich, M., Prieto, M., Cedillo Rosales, S., Thiel, H.-J., Alvarez, M., Becher, P., 2003. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Vet Microbiol* 96, 327-336.
- Audet, S.A., Crim, R.L., Beeler, J., 2000. Evaluation of vaccines, interferons and cell substrates for pestivirus contamination. *Biologicals* 28, 41-46.
- Avalos-Ramirez, R., 2002. Phylogenetische Analysen und antigenetische Verwandtschaft von Pestiviren. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen.
- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Thiel, H.-J., Becher, P., 2001. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286, 456-465.
- Barlic-Maganja, D., Grom, J., 2001. Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridisation assay for the detection and for the discrimination of classical swine fever virus from other pestiviruses. *J Virol Methods* 95, 101-110.
- Barlow, R.M., Gardiner, A.C., Nettleton, P.F., 1983. The pathology of a spontaneous and experimental mucosal disease-like syndrome in sheep recovered from clinical border disease. *J Comp Pathol* 93, 451-461.
- Baroth, M., Orlich, M., Thiel, H.-J., Becher, P., 2000. Insertion of cellular NEDD8 coding sequences in a pestivirus. *Virology* 278, 456-466.
- Baule, C., van Vuuren, M., Lowings, J.P., Belak, S., 1997. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses isolated in Southern Africa. *Virus Res* 52, 205-220.
- Becher, P., Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Cedillo Rosales, S., König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirrmeier, H., Thiel, H.-J., 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311, 96-104.
- Becher, P., König, M., Paton, D.J., Thiel, H.-J., 1995. Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology* 209, 200-206.
- Becher, P., König, M., Thiel, H.-J., 2001. Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease: Molekularbiologie des Erregers, Pathogenese, Labordiagnostik und Bekämpfung. *Tierärztl Prax* 29, 266-275.
- Becher, P., Meyers, G., Shannon, A.D., Thiel, H.-J., 1996. Cytopathogenicity of border disease virus is correlated with integration of cellular sequences into the viral genome. *J Virol* 70, 2992-2998.
- Becher, P., Orlich, M., König, M., Thiel, H.-J., 1999a. Nonhomologous RNA recombination in bovine viral diarrhea virus: molecular characterization of a variety of subgenomic RNAs isolated during an outbreak of fatal mucosal disease. *J Virol* 73, 5646-5653.
- Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König, M., Baroth, M., Thiel, H.-J., 1999b. Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262, 64-71.
- Becher, P., Orlich, M., Shannon, A.D., Horner, G., König, M., Thiel, H.-J., 1997. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* 78 (Pt 6), 1357-1366.
- Becher, P., Orlich, M., Thiel, H.-J., 1998a. Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J Virol* 72, 5165-5173.
- Becher, P., Orlich, M., Thiel, H.-J., 1998b. Ribosomal S27a coding sequences upstream of ubiquitin coding sequences in the genome of a pestivirus. *J Virol* 72, 8697-8704.
- Becher, P., Orlich, M., Thiel, H.-J., 2001a. RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine strain: generation of cytopathogenic virus and induction of lethal disease. *J Virol* 75, 6256-6264.

- Becher, P., König, M., Thiel, H.-J., 2001b. Bovine Virusdiarrhö und Mucosal Disease: Molekularbiologie des Erregers, Pathogenese, Labordiagnostik und Bekämpfung. *Tierärztl Prax* 29, 266-275.
- Becher, P., Shannon, A.D., Tautz, N., Thiel, H.-J., 1994. Molecular characterization of border disease virus, a pestivirus from sheep. *Virology* 198, 542-551.
- Beer, M., Wolf, G., 2003. Impfstoffe zum Schutz gegen eine Infektion mit dem Virus der Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease (BDV/MD): Eine kurze Übersicht. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 116, 252-258.
- Beer, M., Wolf, G., Kaaden, O.R., 2002. Phylogenetic analysis of the 5'-untranslated region of german BVDV type II isolates. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49, 43-47.
- Bhudevi, B., Weinstock, D., 2001. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol* 83, 1-10.
- Bhudevi, B., Weinstock, D., 2003. Detection of bovine viral diarrhea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). *J Virol Methods* 109, 25-30.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bitsch, V., Hansen, K.E., Ronsholt, L., 2000. Experiences from the Danish programme for eradication of bovine virus diarrhoea (BVD) 1994-1998 with special reference to legislation and causes of infection. *Vet Microbiol* 77, 137-143.
- Bolin, S.R., Ridpath, J.F., 1998. Prevalence of bovine viral diarrhea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J Vet Diagn Invest* 10, 135-139.
- Bolin, S.R., Ridpath, J.F., Black, J., Macy, M., Roblin, R., 1994. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhea virus. *J Virol Methods* 48, 211-221.
- Bouma, A., De Smit, A.J., De Jong, M.C., De Kluijver, E.P., Moormann, R.J., 2000. Determination of the onset of the herd-immunity induced by the E2 sub-unit vaccine against classical swine fever virus. *Vaccine* 18, 1374-1381.
- Bouma, A., de Smit, A.J., de Kluijver, E.P., Terpstra, C., Moormann, R.J., 1999. Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 66, 101-114.
- Brinkhof, J., Zimmer, G., Westenbrink, F., 1996. Comparative study on four enzyme-linked immunosorbent assays and a cocultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhoea virus in persistently infected cattle. *Vet Microbiol* 50, 1-6.
- Bruschke, C.J., Haghpasht, A., Hoek, A., Rutten, V.P., Wentink, G.H., van Rijn, P.A., van Oirschot, J.T., 1998a. The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol* 62, 37-50.
- Bruschke, C.J., Weerdmeester, K., Van Oirschot, J.T., Van Rijn, P.A., 1998b. Distribution of bovine virus diarrhoea virus in tissues and white blood cells of cattle during acute infection. *Vet Microbiol* 64, 23-32.
- Canal, C.W., Hotzel, I., de Almeida, L.L., Roehe, P.M., Masuda, A., 1996. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Vet Microbiol* 48, 373-379.
- Canal, C.W., Strasser, M., Hertig, C., Masuda, A., Peterhans, E., 1998. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet Microbiol* 63, 85-97.

- Carman, S., van Dreumel, T., Ridpath, J., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E., Tremblay, R., Bolin, S., Godkin, A., Anderson, N., 1998. Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest* 10, 27-35.
- Collett, M.S., Larson, R., Belzer, S.K., Retzel, E., 1988a. Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* 165, 200-208.
- Collett, M.S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D.K., Purchio, A.F., 1988b. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* 165, 191-199.
- Corapi, W.V., Elliott, R.D., French, T.W., Arthur, D.G., Bezek, D.M., Dubovi, E.J., 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. *J Am Vet Med Assoc* 196, 590-596.
- Corapi, W.V., French, T.W., Dubovi, E.J., 1989. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J Virol* 63, 3934-3943.
- Couvreux, B., Letellier, C., Collard, A., Quenon, P., Dehan, P., Hamers, C., Pastoret, P.P., Kerkhofs, P., 2002. Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res* 85, 17-28.
- Crevat, D., Vandenberg, D., Chappuis, G., Lecomte, C., Renard, A., 1993. Five hours to identify immunotolerant cattle, persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech* 12, 483-492.
- De Moerloose, L., Lecomte, C., Brown-Shimmer, S., Schmetz, D., Guiot, C., Vandenberg, D., Allaer, D., Rossius, M., Chappuis, G., Dina, D., et al., 1993. Nucleotide sequence of the bovine viral diarrhoea virus Osloss strain: comparison with related viruses and identification of specific DNA probes in the 5' untranslated region. *J Gen Virol* 74 (Pt 7), 1433-1438.
- Dekker, A., Wensvoort, G., Terpstra, C., 1995. Six antigenic groups within the genus pestivirus as identified by cross neutralization assays. *Vet Microbiol* 47, 317-329.
- Deng, R., Brock, K.V., 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. *Virology* 191, 867-869.
- Depner, K.R., Bouma, A., Koenen, F., Klinkenberg, D., Lange, E., de Smit, H., Vanderhallen, H., 2001. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial II. Challenge study in pregnant sows. *Vet Microbiol* 83, 107-120.
- Deregt, D., Bolin, S.R., van den Hurk, J., Ridpath, J.F., Gilbert, S.A., 1998a. Mapping of a type 1-specific and a type-common epitope on the E2 (gp53) protein of bovine viral diarrhea virus with neutralization escape mutants. *Virus Res* 53, 81-90.
- Deregt, D., van Rijn, P.A., Wiens, T.Y., van den Hurk, J., 1998b. Monoclonal antibodies to the E2 protein of a new genotype (type 2) of bovine viral diarrhea virus define three antigenic domains involved in neutralization. *Virus Res* 57, 171-181.
- Dettenhofer, M., Yu, X.F., 1999. Highly purified human immunodeficiency virus type 1 reveals a virtual absence of Vif in virions. *J Virol* 73, 1460-1467.
- Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O., 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12, 387-395.
- Dewulf, J., Laevens, H., Koenen, F., Vanderhallen, H., Mintiens, K., Deluyker, H., de Kruif, A., 2000. An experimental infection with classical swine fever in E2 sub-unit marker-vaccine vaccinated and in non-vaccinated pigs. *Vaccine* 19, 475-482.
- Dubovi, E.J., 1990. Molecular biology of bovine virus diarrhoea virus. *Rev Sci Tech* 9, 105-114.
- Dubovi, E.J., 1994. Impact of bovine viral diarrhea virus on reproductive performance in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 10, 503-514.

- Efron, B., Halloran, E., Holmes, S., 1996. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13429-13434.
- Entrican, G., Dand, A., Nettleton, P.F., 1995, A double monoclonal antibody ELISA for detecting pestivirus antigen in the blood of viraemic cattle and sheep. *Vet Microbiol* 43, 65-74.
- Evermann, J.F., Ridpath, J.F., 2002. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhea virus in the northwestern United States. *Vet Microbiol* 89, 129-139.
- Felsenstein, J., 1985, Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 738-791.
- Felsenstein, J., 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu Rev Genet* 22, 521-565.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Interference Package) (Seattle, USA, Department of Genetics, University of Washington).
- Fenton, A., Nettleton, P.F., Entrican, G., Herring, J.A., Malloy, C., Greig, A., Low, J.C., 1991. Identification of cattle infected with bovine virus diarrhoea virus using a monoclonal antibody capture ELISA. *Arch Virol Suppl* 3, 169-174.
- Floegel-Niesmann, G., 2001. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs. *Vet Microbiol* 83, 121-136.
- Flores, E.F., Gil, L.H., Botton, S.A., Weiblen, R., Ridpath, J.F., Kreutz, L.C., Pilati, C., Driemeyer, D., Moojen, V., Wendelstein, A.C., 2000. Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet Microbiol* 77, 175-183.
- Flores, E.F., Ridpath, J.F., Weiblen, R., Vogel, F.S., Gil, L.H., 2002. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res* 87, 51-60.
- Fujisawa, R., McAtee, F.J., Favara, C., Hayes, S.F., Portis, J.L., 2001. N-terminal cleavage fragment of glycosylated Gag is incorporated into murine oncornavirus particles. *J Virol* 75, 11239-11243.
- Fulton, R.W., d'Offay, J.M., Saliki, J.T., Burge, L.J., Helman, R.G., Confer, A.W., Bolin, S.R., Ridpath, J.F., 1999. Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for typing ruminant pestiviruses: bovine viral diarrhea viruses and border disease virus. *Can J Vet Res* 63, 276-281.
- Gaede, W., Gehrmann, B., Körber, R., 2003. BDV-Virämikereliminierung: Effektives Herdenscreening durch Kombination von RT-PCR und Antigen-ELISA in Blut und Milchproben. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 116, 234-239.
- Giangaspero, M., Harasawa, R., Zecconi, A., Luzzago, C., 2001a. Genotypic characteristics of bovine viral diarrhea virus 2 strains isolated in northern Italy. *J Vet Med Sci* 63, 1045-1049.
- Giangaspero, M., Vacirca, G., Harasawa, R., Buttner, M., Panuccio, A., De Giuli Morghen, C., Zanetti, A., Belloli, A., Verhulst, A., 2001b. Genotypes of pestivirus RNA detected in live virus vaccines for human use. *J Vet Med Sci* 63, 723-733.
- Givens, M.D., Galik, P.K., Riddell, K.P., Stringfellow, D.A., Brock, K.V., Bishop, M.D., Eilertsen, K.J., Loskutoff, N.M., 2001. Validation of a reverse transcription nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) to detect bovine viral diarrhea virus (BVDV) associated with in vitro-derived bovine embryos and co-cultured cells. *Theriogenology* 56, 787-799.
- Gottschalk, E.E., Greiser-Wilke, I., Frey, H.R., Liess, B., Moennig, V., 1992. An antigen capture test for the detection of cattle viremic with bovine viral diarrhoea virus--a comparison with BVD virus isolation from buffy coat cells in bovine kidney cells. *Zentralbl Veterinarmed B* 39, 467-472.

- Graham, D.A., McLaren, I.E., Brittain, D., O'Reilly, P.J., 2001. Genetic typing of ruminant pestivirus strains from Northern Ireland and the Republic of Ireland. *Res Vet Sci* 71, 127-134.
- Greiser-Wilke, I., Frey, H.R., Böttcher, J., Liess, B., Moennig, V., 1993. Use of a modified "antigen-capture" enzyme immunoassay for the identification of virus persistence in cattle infected with bovine virus diarrhea (BVD). *Tierarztl Prax* 21, 302-305.
- Hamers, C., Lecomte, C., Kulcsar, G., Lambot, M., Pastoret, P.P., 1998. Persistently infected cattle stabilise bovine viral diarrhea virus leading to herd specific strains. *Vet Microbiol* 61, 177-182.
- Harasawa, R., 1995. Adventitious pestivirus RNA in live virus vaccines against bovine and swine diseases. *Vaccine* 13, 100-103.
- Harlow, D.L., 1988. *ANTIBODIES a Laboratory Manual*, Vol 1, 1 Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 726 p.
- Harpin, S., Elahi, S.M., Cornaglia, E., Yolken, R.H., Elazhary, Y., 1995. The 5'-untranslated region sequence of a potential new genotype of bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol* 140, 1285-1290.
- Hedges, S.B., 1992. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol Biol Evol* 9, 366-369.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-1030.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276-7280.
- Horner, G.W., Tham, K.M., Orr, D., Ralston, J., Rowe, S., Houghton, T., 1995. Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription--polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet Microbiol* 43, 75-84.
- Houe, H., 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64, 89-107.
- Howard, G.C., Bethell, Delia R., 2001. *BASIC METHODS IN Antibody Production and Characterization*, Vol 1, 1 Edition. CRC Press LLC, Florida, USA, 271 p.
- Hughes, L.E., Kershaw, G.F., Shaw, I.G., 1959. "B" or border disease. An undescribed disease of sheep. *Vet. Rec.* 71, 313-317.
- Hyndman, L., Vilcek, S., Conner, J., Nettleton, P.F., 1998. A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. *J Virol Methods* 71, 69-76.
- Jones, L.R., Zandomeni, R., Weber, E.L., 2001. Genetic typing of bovine viral diarrhea virus isolates from Argentina. *Vet Microbiol* 81, 367-375.
- Kärber, G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch exp Pathol Pharmacol* 162, 480.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.
- König, M., Cedillo Rosales, S., Becher, P., Thiel, H.J., 2003. Heterogeneity of ruminant pestiviruses: academic interest or important basis for the development of vaccines and diagnostics? *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 116, 216-221.
- König, M., Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R., Thiel, H.-J., 1995. Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol* 69, 6479-6486.
- Kramps, J.A., van Maanen, C., van de Wetering, G., Stienstra, G., Quak, S., Brinkhof, J., Ronsholt, L., Nylin, B., 1999. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV)

- specific antibodies in cattle serum, plasma and bulk milk. *Vet Microbiol* 64, 135-144.
- Kümmerer, B.M., Stoll, D., Meyers, G., 1998. Bovine viral diarrhea virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J Virol* 72, 4127-4138.
- Laddomada, A., 2000. Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Veterinary Microbiology* 73, 121-130.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, E., Yeo, A., Kraemer, B., Wickens, M., Linial, M.L., 1999. The gag domains required for avian retroviral RNA encapsidation determined by using two independent assays. *J Virol* 73, 6282-6292.
- Lenz, O., ter Meulen, J., Feldmann, H., Klenk, H.D., Garten, W., 2000. Identification of a novel consensus sequence at the cleavage site of the Lassa virus glycoprotein. *J Virol* 74, 11418-11421.
- Letellier, C., Kerkhofs, P., Wellemans, G., Vanopdenbosch, E., 1999. Detection and genotyping of bovine diarrhea virus by reverse transcription-polymerase chain amplification of the 5' untranslated region. *Vet Microbiol* 64, 155-167.
- Lindberg, A.L., Alenius, S., 1999, Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol* 64, 197-222.
- Lindl, T. 2002. Zell- und Gewebekultur (Heidelberg-Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin), p. 316.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K., 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4, 357-362.
- Ludemann, L.R., Katz, J.B., 1994. Enzyme-linked immunosorbent assay assessment of bovine viral diarrhea virus antigen in inactivated vaccines using polyclonal or monoclonal antibodies. *Biologicals* 22, 21-27.
- Luzzago, C., Bandi, C., Bronzo, V., Ruffo, G., Zecconi, A., 2001. Distribution pattern of bovine viral diarrhoea virus strains in intensive cattle herds in Italy. *Vet Microbiol* 83, 265-274.
- Mahlum, C.E., Haugerud, S., Shivers, J.L., Rossow, K.D., Goyal, S.M., Collins, J.E., Faaberg, K.S., 2002. Detection of bovine viral diarrhea virus by TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 14, 120-125.
- McClurkin, A.W., Bolin, S.R., Coria, M.F., 1985. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 186, 568-569.
- McClurkin, A.W., Littledike, E.T., Cutlip, R.C., Frank, G.H., Coria, M.F., Bolin, S.R., 1984. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can J Comp Med* 48, 156-161.
- McGoldrick, A., Lowings, J.P., Ibata, G., Sands, J.J., Belak, S., Paton, D.J., 1998. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). *J Virol Methods* 72, 125-135.
- Meyer, C., Von Freyburg, M., Elbers, K., Meyers, G., 2002. Recovery of virulent and RNase-negative attenuated type 2 bovine viral diarrhea viruses from infectious cDNA clones. *J Virol* 76, 8494-8503.
- Meyers, G., Rümenapf, T., Thiel, H.-J., 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* 171, 555-567.
- Meyers, G., Thiel, H.J., 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Virus Res* 47, 53-118.

- Mignon, B., Dubuisson, J., Baranowski, E., Koromyslov, I., Ernst, E., Boulanger, D., Waxweiler, S., Pastoret, P.P., 1991. A monoclonal ELISA for bovine viral diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J Virol Methods* 35, 177-188.
- Moenning, V., 1990. Pestiviruses: a review. *Vet Microbiol* 23, 35-54.
- Moennig, V., Greiser-Wilke, I., 2003. Perspectives on BVD eradication in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 116, 222-226.
- Moormann, R.J., van Gennip, H.G., Miedema, G.K., Hulst, M.M., van Rijn, P.A., 1996. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J Virol* 70, 763-770.
- Moormann, R.J., Warmerdam, P.A., van der Meer, B., Schaaper, W.M., Wensvoort, G., Hulst, M.M., 1990. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. *Virology* 177, 184-198.
- Müller, A., Depner, K.R., Liess, B., 1996. Evaluation of a gp 55 (E2) recombinant-based ELISA for the detection of antibodies induced by classical swine fever virus. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 103, 451-453.
- Nagai, M., Ito, T., Sugita, S., Genno, A., Takeuchi, K., Ozawa, T., Sakoda, Y., Nishimori, T., Takamura, K., Akashi, H., 2001. Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan. *Arch Virol* 146, 685-696.
- O'Reilly, D.R., Miller, L. K., Luckow, V. A., 1994. *Baculovirus Expression Vectors, a Laboratory Manual*, Vol 1. Oxford University Press, Inc., Oxford, 347 p.
- Olafson, P., Mac Cullum, A. D., Fox, F. H., 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet* 36, 205-207.
- Park, J.S., Moon, H.J., Lee, B.C., Hwang, W.S., Yoo, H.S., Kim, D.Y., Park, B.K., 2004. Comparative analysis on the 5'-untranslated region of bovine viral diarrhoea virus isolated in Korea. *Res Vet Sci* 76, 157-163.
- Paton, D.J., Carlsson, U., Lowings, J.P., Sands, J.J., Vilcek, S., Alenius, S., 1995. Identification of herd-specific bovine viral diarrhoea virus isolates from infected cattle and sheep. *Vet Microbiol* 43, 283-294.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte, J., Tussen, P., 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 203, 260-268.
- Pietschmann, T., Lohmann, V., Kaul, A., Krieger, N., Rinck, G., Rutter, G., Strand, D., Bartenschlager, R., 2002. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 76, 4008-4021.
- Rabilloud, T., 1990. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* 11, 785-794.
- Radwan, G.S., Brock, K.V., Hogan, J.S., Smith, K.L., 1995. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 44, 77-91.
- Ramsey, F.K., Chivers, W.H., 1953. Mucosal disease of cattle. *North Am Vet* 34, 629-633.
- Reddy, J.R., Kwang, J., Okwumabua, O., Kapil, S., Loughin, T.M., Lechtenberg, K.F., Chengappa, M.M., Minocha, H.C., 1997. Application of recombinant bovine viral diarrhoea virus proteins in the diagnosis of bovine viral diarrhoea infection in cattle. *Vet Microbiol* 57, 119-133.
- Reddy, J.R., Xue, W., Rivera, S., Minocha, H.C., 1995. Antigenic differences between a field isolate and vaccine strains of bovine viral diarrhoea virus. *J Clin Microbiol* 33, 2159-2161.
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R., 1995a. Delayed onset postvaccinal mucosal disease as a result of genetic recombination between genotype 1 and genotype 2 BVDV. *Virology* 212, 259-262.

- Ridpath, J.F., Bolin, S.R., 1995b. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 212, 39-46.
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R., 1997. Comparison of the complete genomic sequence of the border disease virus, BD31, to other pestiviruses. *Virus Res* 50, 237-243.
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R., 1998. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol Cell Probes* 12, 101-106.
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R., Dubovi, E.J., 1994. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* 205, 66-74.
- Ridpath, J.F., Hietala, S.K., Sorden, S., Neill, J.D., 2002. Evaluation of the reverse transcription-polymerase chain reaction/probe test of serum samples and immunohistochemistry of skin sections for detection of acute bovine viral diarrhea infections. *J Vet Diagn Invest* 14, 303-307.
- Ridpath, J.F., Neill, J.D., Frey, M., Landgraf, J.G., 2000. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol* 77, 145-155.
- Risatti, G.R., Callahan, J.D., Nelson, W.M., Borca, M.V., 2003. Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* 41, 500-505.
- Roeder, P.L., Drew, T.W., 1984. Mucosal disease of cattle: a late sequel to fetal infection. *Vet Rec* 114, 309-313.
- Roehe, P.M., Woodward, M.J., Edwards, S., 1992. Characterisation of p20 gene sequences from a border disease-like pestivirus isolated from pigs. *Vet Microbiol* 33, 231-238.
- Rossmannith, W., Vilcek, S., Wenzl, H., Rossmannith, E., Loitsch, A., Durkovic, B., Strojny, L., Paton, D.J., 2001. Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program. *Vet Microbiol* 81, 207-218.
- Rümenapf, T., Stark, R., Meyers, G., Thiel, H.-J., 1991. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *J Virol* 65, 589-597.
- Rümenapf, T., Unger, G., Strauss, J.H., Thiel, H.-J., 1993. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J Virol* 67, 3288-3294.
- Ryan, M.D., Monaghan, S., Flint, M., 1998. Virus-encoded proteinases of the Flaviviridae. *J Gen Virol* 79 (Pt 5), 947-959.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Sakoda, Y., Ozawa, S., Damrongwatanapokin, S., Sato, M., Ishikawa, K., Fukusho, A., 1999. Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestiviruses mainly isolated in Japan. *Vet Microbiol* 65, 75-86.
- Sandvik, T., 1999. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol* 64, 123-134.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24, 104-108.
- Sasaki, T., Harasawa, R., Shintani, M., Fujiwara, H., Sasaki, Y., Horino, A., Kenri, T., Asada, K., Kato, I., Chino, F., 1996. Application of PCR for detection of mycoplasma DNA and pestivirus RNA in human live viral vaccines. *Biologicals* 24, 371-375.
- Schaarschmidt, U., Schirrmeier, H., Strebelow, G., Wolf, G., 2000. Detection of border disease virus in a sheep flock in Saxony. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 113, 284-288.

- Schagger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Scheibner, H., Frey, H.R., Eicken, K., Meyer, H., Greiser-Wilke, I., 2000. Detection of the genome of bovine viral diarrhea virus (BVDV) using the polymerase chain reaction after reverse transcription (RT-PCR): comparison of methods for the isolation of ribonucleic acid (RNA) from clinical samples. *Deutsch Tierärztl Wochenschr* 107, 431-437.
- Schelp, C., Greiser-Wilke, I., 2003. BDV-Diagnostik: Ein Überblick. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 116, 227-233.
- Scherer, C.F., Flores, E.F., Weiblen, R., Caron, L., Irigoyen, L.F., Neves, J.P., Maciel, M.N., 2001. Experimental infection of pregnant ewes with bovine viral diarrhea virus type-2 (BVDV-2): effects on the pregnancy and fetus. *Vet Microbiol* 79, 285-299.
- Schirrmeier, H., Strebelow, G., Depner, K.R., Beer, M., 2002. Heterogenicity of Pestiviruses: Determination and Characterisation of Novel Genotypes and Species. In: 5TH European Society of Veterinary Virology Pestivirus Symposium, St. John's College, Cambridge, p. 109.
- Schneider, C., Newman, R.A., Sutherland, D.R., Asser, U., Greaves, M.F., 1982. A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem* 257, 10766-10769.
- Sekiguchi, J., Shuman, S., 1994. Vaccinia topoisomerase binds circumferentially to DNA. *J Biol Chem* 269, 31731-31734.
- Shannon, A.D., Richards, S.G., Kirkland, P.D., Moyle, A., 1991. An antigen-capture ELISA detects pestivirus antigens in blood and tissues of immunotolerant carrier cattle. *J Virol Methods* 34, 1-12.
- Shimazaki, T., Sekiguchi, H., Nakamura, S., Taguchi, K., Inoue, Y., Satoh, M., 1998. Segregation of bovine viral diarrhea virus isolated in Japan into genotypes. *J Vet Med Sci* 60, 579-583.
- Shuman, S., 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269, 32678-32684.
- Stoffregen, B., Bolin, S.R., Ridpath, J.F., Pohlenz, J., 2000. Morphologic lesions in type 2 BVDV infections experimentally induced by strain BVDV2-1373 recovered from a field case. *Vet Microbiol* 77, 157-162.
- Stringfellow, D.A., Riddell, K.P., Galik, P.K., Damiani, P., Bishop, M.D., Wright, J.C., 2000. Quality controls for bovine viral diarrhea virus-free IVF embryos. *Theriogenology* 53, 827-839.
- Studer, E., Bertoni, G., Candrian, U., 2002. Detection and characterization of pestivirus contaminations in human live viral vaccines. *Biologicals* 30, 289-296.
- Swain, M., Ross, N.W., 1995. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 16, 948-951.
- Tajima, M., 2004. Bovine viral diarrhea virus 1 is classified into different subgenotypes depending on the analyzed region within the viral genome. *Vet Microbiol* 99, 131-138.
- Tajima, M., Frey, H.R., Yamato, O., Maede, Y., Moennig, V., Scholz, H., Greiser-Wilke, I., 2001. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res* 76, 31-42.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G., Thiel, H.-J., 1997. Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J Virol* 71, 5415-5422.

- Tautz, N., Kaiser, A., Thiel, H.-J., 2000. NS3 serine protease of bovine viral diarrhea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* 273, 351-363.
- Tautz, N., Meyers, G., Thiel, H.-J., 1993. Processing of poly-ubiquitin in the polyprotein of an RNA virus. *Virology* 197, 74-85.
- Tautz, N., Thiel, H.-J., Dubovi, E.J., Meyers, G., 1994. Pathogenesis of mucosal disease: a cytopathogenic pestivirus generated by an internal deletion. *J Virol* 68, 3289-3297.
- The OIE, S.C. 2000. MANUAL OF STANDARDS FOR DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES. Lists A and B diseases of mammals, birds and bees (Paris, France, Office International des Épizooties).
- Thiel, H.-J., Plagemann, P.G.W., Moennig, V., 1996. Pestiviruses, In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.) *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York, pp. 1059-1073.
- Thiel, H.-J., Stark, R., Meyers, G., Weiland, E., Rümenapf, T., 1992. Proteins encoded in the 5' region of the pestivirus genome-considerations concerning taxonomy. *Vet Microbiol* 33, 213-219.
- Tijssen, P., Pellerin, C., Lecomte, J., van den Hurk, J., 1996. Immunodominant E2 (gp53) sequences of highly virulent bovine viral diarrhea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses. *Virology* 217, 356-361.
- Unger, G., 1993. Proteinbiochemische und strukturelle Analysen des Virus der Klassischen Schweinepest. Dissertation. Die Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen.
- Uttenthal, A., Le Potier, M.F., Romero, L., De Mia, G.M., Floegel-Niesmann, G., 2001. Classical swine fever (CSF) marker vaccine. Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Vet Microbiol* 83, 85-106.
- van Oirschot, J.T., 1983. Congenital infections with nonarbo togaviruses. *Vet Microbiol* 8, 321-361.
- van Oirschot, J.T., Bruschke, C.J., van Rijn, P.A., 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol* 64, 169-183.
- van Rijn, P.A., Bossers, A., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1996. Classical swine fever virus (CSFV) envelope glycoprotein E2 containing one structural antigenic unit protects pigs from lethal CSFV challenge. *J Gen Virol* 77 (Pt 11), 2737-2745.
- van Rijn, P.A., van Gennip, H.G., Moormann, R.J., 1999. An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic test both based on envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus (CSFV). *Vaccine* 17, 433-440.
- Vilcek, S., 2001. Identification of pestiviruses contaminating cell lines and fetal calf sera. *Acta Virol* 45, 81-86.
- Vilcek, S., Belak, S., 1996. Genetic identification of pestivirus strain Frijters as a border disease virus from pigs. *J Virol Methods* 60, 103-108.
- Vilcek, S., Drew, T.W., McGoldrick, A., Paton, D.J., 1999. Genetic typing of bovine pestiviruses from England and Wales. *Vet Microbiol* 69, 227-237.
- Vilcek, S., Greiser-Wilke, I., Durkovic, B., Obritzhauser, W., Deutz, A., Kofer, J., 2003a. Genetic diversity of recent bovine viral diarrhoea viruses from the southeast of Austria (Styria). *Vet Microbiol* 91, 285-291.
- Vilcek, S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J., 1994. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 136, 309-323.
- Vilcek, S., Mojzisova, J., Bajova, V., Paulik, S., Strojny, L., Durkovic, B., Hipikova, V., 2003b. A survey for BVDV antibodies in cattle farms in Slovakia and genetic typing of BVDV isolates from imported animals. *Acta Vet Hung* 51, 229-236.

- Vilcek, S., Nettleton, P.F., Paton, D.J., Belak, S., 1997. Molecular characterization of ovine pestiviruses. *J Gen Virol* 78 (Pt 4), 725-735.
- Vilcek, S., Paton, D.J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., Loitsch, A., Rossmanith, W., Vega, S., Scicluna, M.T., Paifi, V., 2001. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch Virol* 146, 99-115.
- Vilcek, S., Ridpath, J.F., Van Campen, H., Cavendish, J., 2001. A novel pestivirus genotype isolated from pronghorn antelope. Nicht veröffentlicht. AF410791.
- Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F., Thiel, H.-J., 1992. A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J Virol* 66, 3677-3682.
- Weiland, E., Stark, R., Haas, B., Rümenapf, T., Meyers, G., Thiel, H.-J., 1990. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J Virol* 64, 3563-3569.
- Williams, D.C., Soper, S.A., 1995. Ultrasensitive near-IR fluorescence detection for capillary gel electrophoresis and DNA sequencing applications. *Anal Chem* 67, 3427-3432.
- Windisch, J.M., Schneider, R., Stark, R., Weiland, E., Meyers, G., Thiel, H.-J., 1996. RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J Virol* 70, 352-358.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 130-131, 134-138.
- Wolfmeyer, A., Wolf, G., Beer, M., Strube, W., Hehnen, H.R., Schmeer, N., Kaaden, O.R., 1997. Genomic (5'UTR) and serological differences among German BVDV field isolates. *Arch Virol* 142, 2049-2057.

7. ANHANG

7.1. Distanzmatrix von N^{pro}-Gen Sequenze

1 Gi-4	43 A-AU
2 Gi-5	44 L-AU
3 Gi-7	45 10558
4 Gi-6	46 11468
5 Soldan	47 J-AU
6 ED	48 W-AU
7 Antilope-1	49 G-AU
8 890	50 S10
9 C413	51 3-It
10 Parker	52 S14-1
11 12524	53 26-F
12 Gi-2	54 Deer-NZ1
13 18605	55 519
14 3709	56 Buffalo-A1
15 659	57 C79
16 2230	58 SD-1
17 653	59 Paplitz
18 SCP	60 Oregon
19 28508-5	61 C86
20 287-7KH	62 700097
21 871	63 221
22 14652	64 NADL
23 14657	65 Singer
24 14658	66 200085
25 19371	67 Deer-GB1
26 22531	68 2313-UK
27 721	69 PG2
28 K7-00	70 Giraffe-1
29 CP7	71 Alfort-T
30 5785ncp	72 Schweinf
31 RIT	73 Glentorf
32 NewYork-1	74 C-strain
33 18602	75 AZ79
34 Goat-G1	76 Reindeer-1
35 5273-2	77 17385
36 14816	78 466
37 S14-2	79 137-4
38 22424	80 V2536
39 4478	81 BD-31
40 Osloss	82 L83-84
41 Antilope-G2	83 X818
	84 Gifhorn
	85 Hobi
42 387KH	86 Pronghorn-antelope

Matrix 1: Part 1

[illegible]

Matrix 1: Part 2

[illegible]

Matrix 1: Part 3

		25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
	1		44.40	44.55	41.68	43.92	45.82	45.53	45.88	43.18	44.78	43.63	43.13	45.12
	2		41.79	43.47	41.01	40.27	41.69	41.79	42.40	40.32	42.23	42.28	41.02	42.56
	3		40.72	41.59	40.02	41.55	43.08	42.40	41.21	40.93	43.24	42.12	42.40	42.40
	4		38.94	39.77	38.55	43.13	43.92	44.96	45.18	42.12	44.90	44.15	45.12	44.43
	5		42.60	43.13	42.55	42.02	43.18	42.90	44.03	42.56	41.40	42.23	41.73	40.51
	6		39.73	40.14	39.98	40.84	38.65	39.81	38.33	38.76	38.76	38.44	37.65	36.89
	7		39.73	40.14	39.98	40.84	38.65	39.81	38.33	38.76	38.76	38.44	37.65	36.89
	8		40.51	40.93	40.39	37.97	38.33	39.49	37.65	38.44	38.44	37.41	35.95	35.56
	9		39.45	39.85	40.06	39.37	38.65	39.08	37.62	38.76	38.40	38.08	35.98	36.89
	10		39.85	41.02	41.97	39.12	38.76	39.94	38.44	37.45	37.80	37.48	36.71	36.29
	11		38.58	40.14	39.62	40.93	39.08	38.88	38.40	38.48	39.85	39.90	38.72	39.01
	12		38.58	40.14	39.62	40.93	39.08	38.88	38.40	38.48	39.85	39.90	38.72	39.01
	13		38.61	40.18	39.66	40.51	39.41	39.21	38.72	38.80	40.18	40.23	39.04	39.33
	14		38.23	39.77	39.26	41.21	39.01	38.80	38.33	38.40	39.77	39.81	38.65	38.94
	15		39.30	40.88	40.35	41.97	40.10	39.90	39.41	39.49	40.88	40.93	39.73	40.02
	16		39.88	41.46	39.92	41.79	40.31	39.73	39.98	40.06	40.72	40.76	39.59	39.88
	17		38.92	40.51	39.97	41.21	38.99	38.79	38.31	38.75	40.13	40.18	38.99	38.92
	18		40.60	42.67	43.24	40.14	39.49	40.60	39.53	39.62	40.27	39.21	39.49	39.77
	19		38.97	39.81	41.13	41.64	41.64	40.69	40.93	42.17	39.53	39.21	37.69	37.97
	20		8.27	8.34	8.05	29.16	24.46	27.42	24.42	28.22	25.66	26.97	26.33	26.78
	21		7.15	7.45	9.48	27.62	23.03	25.30	23.59	24.81	22.40	23.63	23.63	24.99
	22		0.60	6.07	9.45	27.84	24.77	26.47	24.73	26.60	24.42	25.70	24.46	25.93
	23		0.80	6.29	9.69	28.17	25.08	26.78	25.04	26.92	24.12	25.39	24.16	26.24
	24		0.80	6.28	9.67	28.12	25.04	26.74	24.99	26.88	24.69	25.97	24.42	25.88
	25		0.00	6.73	10.14	28.12	25.04	26.74	24.99	26.88	24.69	25.97	24.73	26.20
	26			0.00	8.34	28.72	25.58	28.61	26.48	27.78	27.45	27.83	26.85	28.28
	27				0.00	30.86	27.29	28.39	26.29	28.22	28.55	29.28	27.95	29.39
	28					0.00	6.74	8.31	8.27	9.46	15.84	14.51	16.08	14.51
	29						0.00	6.49	7.38	7.63	14.53	13.99	15.29	14.51
	30							0.00	5.37	7.13	13.97	13.45	13.70	13.70
	31								0.00	6.92	14.46	13.68	14.70	14.44
	32									0.00	13.58	12.80	14.32	14.48
	33										0.00	2.85	4.54	8.50
	34											0.00	4.53	8.95
	35												0.00	8.49
	36													0.00

Matrix 1: Part 4

		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	..
	1	46.71	45.70	45.35	44.05	45.24	45.24	39.98	41.84	41.64	41.26	37.80	39.25	
	2	43.29	43.63	43.29	40.14	41.26	41.64	38.40	39.77	39.67	39.30	37.25	36.90	
	3	42.35	44.55	44.21	40.68	42.17	42.17	38.94	41.59	41.69	41.30	37.13	37.48	
	4	45.59	46.65	45.88	42.60	44.55	43.76	38.97	40.51	43.97	43.58	41.23	39.44	
	5	42.84	43.47	43.13	40.02	41.13	42.64	39.95	40.02	40.39	40.39	37.41	35.67	
	6	39.33	41.13	40.43	37.16	39.98	37.50	38.61	40.51	39.49	39.85	37.17	38.97	
	7	39.33	41.13	40.43	37.16	39.98	37.50	38.61	40.51	39.49	39.85	37.17	38.97	
	8	38.29	38.61	37.94	36.16	37.53	36.84	37.59	39.08	37.37	37.72	35.88	38.38	
	9	39.69	39.66	38.97	37.50	38.55	37.50	38.61	40.88	39.12	39.49	36.19	37.97	
	10	38.36	40.51	39.81	37.24	37.94	37.59	38.36	39.90	38.16	37.80	37.65	40.14	
	11	40.80	41.50	41.17	37.85	39.98	39.26	36.52	37.97	38.04	37.69	35.77	38.33	
	12	40.80	41.50	41.17	37.85	39.98	39.26	36.52	37.97	38.04	37.69	35.77	38.33	
	13	41.13	41.09	40.76	38.17	40.31	39.59	37.18	38.65	38.72	38.36	35.81	38.38	
	14	40.72	41.42	41.09	37.80	39.92	39.20	37.16	38.61	38.68	38.33	35.77	38.33	
	15	41.84	42.55	42.22	38.84	41.01	40.28	37.85	39.33	39.41	39.04	36.46	39.07	
	16	41.68	41.64	41.31	38.74	40.88	40.52	39.14	40.64	40.43	40.06	37.02	39.62	
	17	40.71	41.80	41.46	37.77	39.90	39.18	37.47	38.96	38.67	38.67	36.09	38.32	
	18	41.21	40.88	41.59	38.94	40.76	39.66	38.29	39.81	39.25	38.88	37.57	39.02	
	19	39.73	38.33	38.29	37.18	40.76	38.23	39.01	40.47	38.08	37.72	37.21	38.65	
	20	27.37	25.17	25.12	25.35	26.51	24.04	27.70	26.42	28.71	29.04	28.07	28.95	
	21	25.57	24.33	24.29	23.59	25.04	24.12	26.51	24.34	28.48	28.80	25.61	26.47	
	22	25.88	24.55	24.51	25.04	26.51	25.04	22.27	22.56	27.20	26.88	27.84	28.07	
	23	26.20	24.86	24.81	25.35	26.83	25.35	21.98	22.27	27.51	27.20	27.52	27.74	
	24	25.84	24.51	24.46	24.99	26.47	24.99	22.52	22.82	27.47	27.15	28.12	28.34	
	25	26.15	24.81	24.77	25.30	26.78	24.69	22.52	22.82	27.24	26.92	28.12	28.34	
	26	28.55	27.62	27.56	28.44	27.02	26.70	25.97	26.29	29.23	28.90	30.30	29.84	
	27	31.38	27.40	27.35	28.22	28.12	24.95	30.12	28.12	29.04	28.71	28.07	29.62	
	28	15.00	14.35	13.86	14.32	14.27	16.11	25.89	26.11	25.76	25.45	24.51	27.57	
	29	14.23	14.61	14.12	12.30	13.76	14.02	23.50	22.22	24.30	24.61	23.98	25.12	
	30	14.18	15.08	14.58	13.26	13.21	14.23	26.43	25.39	25.06	25.37	23.22	24.73	
	31	14.67	14.27	14.30	13.74	12.53	14.25	25.75	25.35	25.95	26.26	23.18	27.10	
	32	14.46	15.37	14.87	13.53	14.25	14.25	27.45	25.75	26.51	26.20	21.93	24.24	
	33	8.95	9.23	8.78	8.31	10.61	11.58	26.48	25.75	27.79	28.12	24.33	23.63	
	34	9.41	9.69	9.23	8.53	10.35	11.56	26.43	25.70	28.39	28.72	23.98	24.81	
	35	8.94	8.75	8.30	7.84	9.41	10.83	25.48	26.02	28.72	29.05	23.98	24.20	
	36	3.69	6.05	5.61	5.84	7.81	8.27	23.33	24.16	25.68	25.98	22.40	22.33	
	37	0.00	6.48	6.05	5.83	7.80	8.72	24.81	25.04	26.26	26.57	24.46	23.78	
	38		0.00	0.40	5.19	8.09	8.79	23.42	23.63	27.74	28.07	23.90	24.73	
	39			0.00	4.77	7.65	8.57	23.76	23.98	27.37	27.70	23.33	24.16	
	40				0.00	6.05	7.62	24.90	25.12	26.11	26.42	23.86	24.69	
	41					0.00	9.01	26.70	26.60	27.51	27.83	24.38	25.22	
	42						0.00	26.06	26.29	29.46	29.79	26.56	26.15	
	43							0.00	5.83	17.96	17.69	18.43	16.74	

Matrix 1: Part 4

		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
	44								0.00	19.27	18.99	19.48	17.76	..
	45									0.00	0.20	15.69	17.23	
	46										0.00	15.43	17.49	
	47											0.00	9.75	
	48												0.00	

Matrix 1: Part 5

		49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
	1	48.41	39.69	37.88	43.92	39.77	42.60	45.05	47.06	42.31	41.17	42.35	42.35	..
	2	45.58	38.76	36.61	43.63	40.23	40.14	42.13	43.66	39.57	38.84	40.74	40.74	
	3	44.84	41.97	39.33	42.12	38.36	43.52	46.82	48.07	41.97	40.10	40.88	40.88	
	4	46.01	40.32	37.72	43.07	41.18	43.97	47.71	48.14	44.90	41.73	45.37	45.37	
	5	43.24	41.21	40.43	45.06	42.35	42.35	45.59	44.90	42.07	39.45	42.79	42.79	
	6	41.73	36.58	39.37	40.27	39.94	43.29	43.76	44.55	39.41	40.14	41.30	41.30	
	7	41.73	36.58	39.37	40.27	39.94	43.29	43.76	44.55	39.41	40.14	41.30	41.30	
	8	40.65	36.61	37.27	39.21	39.62	41.02	42.64	42.64	39.45	38.72	42.12	42.12	
	9	43.18	37.62	38.29	40.27	38.84	41.35	42.98	42.98	40.51	39.77	41.69	41.69	
	10	43.07	38.44	38.40	41.56	40.47	41.12	43.52	43.92	42.17	41.79	43.41	43.41	
	11	42.51	38.04	39.08	40.27	37.41	43.58	44.05	44.84	40.51	40.14	41.30	41.30	
	12	42.51	38.04	39.08	40.27	37.41	43.58	44.05	44.84	40.51	40.14	41.30	41.30	
	13	43.24	38.72	39.77	40.97	38.08	43.92	44.40	45.59	41.21	40.84	42.02	42.02	
	14	42.79	38.33	39.37	40.55	37.69	43.47	43.96	45.14	41.17	40.80	41.97	41.97	
	15	43.97	39.41	40.47	41.69	38.76	44.66	45.14	46.35	41.92	41.55	42.74	42.74	
	16	45.35	40.72	41.79	43.03	39.69	44.84	45.35	46.55	42.13	41.75	43.71	43.71	
	17	43.20	38.67	40.09	40.93	38.02	44.28	44.37	45.27	40.79	40.42	41.60	41.60	
	18	43.07	40.93	41.64	41.73	38.80	44.55	45.82	47.49	42.56	40.65	41.84	41.84	
	19	40.65	37.72	35.27	41.07	37.09	42.74	44.01	43.62	40.65	41.02	41.84	41.84	
	20	25.10	22.92	24.91	28.95	27.57	24.65	24.95	25.88	23.00	23.85	24.46	24.46	
	21	23.97	22.70	25.61	28.72	27.35	25.04	25.97	25.66	23.98	23.03	25.48	25.48	
	22	25.18	23.22	24.61	28.30	25.97	24.73	25.66	23.29	25.75	25.41	26.02	26.02	
	23	25.49	22.92	24.30	27.97	25.66	25.04	25.35	23.59	25.44	25.73	26.33	26.33	
	24	25.14	23.48	24.87	28.34	26.02	24.69	25.61	23.26	26.02	25.68	26.06	26.06	
	25	24.83	22.89	24.87	28.57	26.88	24.99	25.93	23.55	25.39	25.04	25.66	25.66	
	26	24.95	24.59	26.97	28.50	27.78	25.75	26.38	25.44	24.38	25.62	27.18	27.18	
	27	27.05	23.82	25.53	28.95	27.24	27.15	28.45	28.12	25.12	24.78	27.62	27.62	
	28	24.16	25.78	26.91	31.03	26.97	26.33	27.52	22.59	24.73	23.29	24.68	24.68	
	29	23.72	21.57	24.16	25.88	23.63	24.64	23.33	20.42	22.77	21.66	22.13	22.13	
	30	24.69	22.68	24.38	28.02	25.70	24.77	24.91	21.94	22.60	22.90	22.78	22.78	
	31	22.63	22.04	23.72	27.33	25.35	25.04	24.04	21.98	20.80	22.04	22.52	22.52	
	32	23.46	23.24	24.33	27.65	26.60	25.53	24.51	22.70	25.09	24.88	24.42	24.42	

Matrix 1: Part 5

[illegible]

Matrix 1: Part 6

		61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	..
	1	40.68	45.47	45.47	44.95	44.55	42.02	41.05	40.76	44.61	45.35	44.16	45.30	
	2	37.65	40.23	40.23	40.97	42.79	40.39	37.53	40.18	47.32	47.37	43.87	44.64	
	3	41.46	43.92	43.92	43.03	43.42	41.31	38.20	39.69	45.35	44.22	44.59	45.38	
	4	43.13	44.49	44.49	45.59	46.01	44.10	38.65	39.81	42.85	41.84	44.73	45.15	
	5	39.69	40.65	40.65	40.84	41.21	39.92	40.43	38.04	46.76	45.49	47.23	47.26	
	6	39.66	43.29	43.29	45.59	44.66	43.71	38.94	40.55	42.09	45.95	45.38	46.57	
	7	39.66	43.29	43.29	45.59	44.66	43.71	38.94	40.55	42.47	45.54	45.76	46.97	
	8	39.33	39.90	39.90	43.63	44.32	41.09	39.33	39.85	44.45	47.95	46.12	45.76	
	9	38.94	41.26	41.26	43.58	44.66	41.42	41.13	41.69	44.70	48.62	46.09	45.73	
	10	41.64	43.47	43.47	46.63	47.77	43.47	41.26	42.62	45.95	47.95	45.47	45.12	
	11	41.13	41.73	41.73	43.58	44.26	41.05	37.53	38.29	46.20	45.44	41.33	42.78	
	12	41.13	41.73	41.73	43.58	44.26	41.05	37.53	38.29	46.20	45.44	41.33	42.78	
	13	41.84	42.45	42.45	44.32	45.01	41.38	38.20	38.97	45.84	45.49	41.35	42.81	
	14	41.79	42.40	42.40	44.26	44.95	40.98	37.82	38.58	46.30	45.14	41.01	42.46	
	15	42.55	43.18	43.18	45.06	45.76	42.09	38.87	39.66	47.42	46.65	42.04	43.52	
	16	42.77	43.37	43.37	45.24	45.95	42.32	39.23	40.25	47.01	46.46	42.73	44.22	
	17	41.46	42.03	42.03	43.88	44.58	41.72	38.50	38.92	46.28	45.87	41.32	42.78	
	18	43.18	45.09	45.09	44.96	47.34	42.31	40.43	41.26	51.22	49.10	47.13	48.82	
	19	40.88	43.35	43.35	43.24	44.43	39.69	37.91	39.41	49.60	47.53	42.83	40.33	
	20	22.74	25.35	25.35	23.37	23.29	26.47	27.07	25.53	42.73	43.53	43.31	41.13	
	21	23.11	25.12	25.12	23.76	22.78	24.99	23.11	24.69	43.11	45.49	43.31	41.86	
	22	25.17	25.97	25.97	24.59	24.51	26.15	23.63	25.84	43.57	45.09	44.45	42.59	
	23	25.48	26.29	26.29	24.90	24.81	26.47	23.94	25.53	43.57	45.09	44.45	42.59	
	24	25.44	26.24	26.24	24.86	24.77	26.42	23.90	25.80	43.23	44.75	44.49	42.63	
	25	24.81	25.61	25.61	24.24	24.77	26.42	23.29	26.11	43.62	44.35	43.72	41.88	
	26	25.99	27.13	27.78	23.55	23.46	26.33	25.36	27.95	45.54	44.01	45.62	43.34	
	27	25.48	27.89	28.55	24.29	24.81	25.84	24.64	28.07	43.19	45.09	43.69	41.13	
	28	23.46	26.43	26.11	26.64	27.51	26.06	24.88	28.01	46.60	41.68	49.04	47.85	
	29	20.08	24.11	24.42	24.93	25.78	24.07	21.62	27.13	46.71	41.75	48.22	47.05	
	30	21.89	25.70	26.02	26.21	27.07	24.73	21.16	26.91	44.61	43.49	48.95	46.18	
	31	22.22	25.12	24.51	24.38	24.59	23.55	21.71	26.21	45.75	42.02	47.53	45.97	
	32	23.81	26.80	27.13	27.67	28.56	24.55	20.05	24.21	46.15	43.53	48.17	46.22	
	33	22.60	24.29	23.98	23.85	25.63	23.94	23.38	26.42	46.76	43.71	47.37	46.61	
	34	21.97	25.17	25.48	25.36	27.18	24.51	23.64	25.73	46.71	44.45	48.13	46.97	
	35	22.86	24.86	24.55	25.68	27.18	23.29	23.94	26.37	48.37	45.14	48.63	47.05	
	36	24.29	25.70	25.70	23.72	25.89	26.60	23.33	26.48	45.09	43.66	47.01	46.65	
	37	26.11	25.97	25.97	25.53	27.45	27.20	23.29	29.73	45.84	44.40	48.91	48.54	
	38	22.94	24.64	24.64	22.98	24.73	24.29	24.35	26.37	44.92	43.87	47.33	46.57	
	39	22.68	24.38	24.38	22.72	24.47	24.02	24.09	26.10	44.57	43.53	47.30	46.54	
	40	22.30	24.29	24.29	23.85	25.41	24.24	21.28	25.99	43.49	41.34	47.69	46.93	
	41	22.81	23.00	23.59	22.56	24.29	25.08	24.21	26.85	46.86	43.45	47.37	46.61	
	42	24.95	27.67	27.67	25.63	28.44	27.29	22.68	27.83	47.58	45.31	46.84	45.71	
	43	23.11	23.90	24.51	21.97	24.29	24.55	21.06	20.84	51.84	44.79	46.57	47.33	

Matrix 1: Part 6

[illegible]

Matrix 1: Part 7

		73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	..
	1	42.83	44.35	42.66	42.97	45.44	46.33	45.75	49.72	51.84	52.15	44.96	47.05	
	2	43.25	44.80	43.41	43.41	44.65	48.87	48.20	53.26	51.97	54.43	46.96	48.87	
	3	44.42	45.23	43.76	43.76	45.00	47.90	43.45	48.93	51.02	52.67	48.25	47.17	
	4	44.61	45.44	43.79	45.35	44.18	46.81	45.95	50.40	51.66	52.42	46.35	48.87	
	5	45.90	44.77	47.63	46.81	46.91	47.01	45.40	49.35	49.72	50.46	47.73	47.17	
	6	43.69	45.66	45.44	47.01	49.56	51.43	47.06	48.56	53.96	49.56	48.09	47.53	
	7	44.07	46.06	45.83	47.41	49.98	51.86	46.65	48.14	53.50	49.98	47.68	47.13	
	8	43.28	44.84	46.73	46.73	49.61	50.73	48.50	47.89	55.44	49.50	47.73	47.58	
	9	44.00	45.58	45.97	47.09	48.40	49.93	48.01	48.25	53.96	48.22	47.27	46.33	
	10	44.18	45.00	47.13	47.94	49.72	49.46	47.23	49.16	55.92	48.77	46.91	48.51	
	11	44.07	46.46	48.82	47.99	48.09	51.86	48.44	50.40	53.65	52.42	49.04	49.29	
	12	44.07	46.46	48.82	47.99	48.09	51.86	48.44	50.40	53.65	52.42	49.04	49.29	
	13	44.42	46.81	48.45	47.63	47.73	51.48	49.23	50.33	53.26	52.04	48.68	49.66	
	14	44.07	46.46	48.93	48.09	48.20	51.97	48.44	50.40	53.80	52.57	49.16	49.29	
	15	45.15	47.58	50.09	49.24	49.35	53.19	50.03	52.04	55.05	53.80	50.33	50.46	
	16	45.47	47.49	49.98	49.98	50.52	53.52	49.78	51.77	54.43	54.11	48.93	50.35	
	17	44.40	46.80	48.56	47.72	47.83	51.55	48.49	50.47	53.43	52.20	48.79	48.92	
	18	47.48	47.95	48.04	46.81	46.10	50.73	48.25	51.08	55.92	52.67	50.27	48.09	
	19	42.29	43.07	46.57	46.18	47.45	48.06	46.50	48.40	57.88	55.29	50.27	49.56	
	20	43.11	41.58	48.07	49.96	48.80	47.00	46.94	45.54	47.53	44.40	47.36	48.86	
	21	43.87	43.07	46.82	50.40	47.95	48.70	46.52	44.75	47.12	44.79	45.70	46.76	
	22	43.49	41.21	46.71	49.41	46.60	46.46	47.49	44.84	48.07	44.90	45.41	47.59	
	23	43.49	41.21	46.71	49.41	46.60	46.46	47.49	44.84	48.07	44.90	45.41	47.59	
	24	43.53	41.24	46.76	49.47	46.65	46.11	47.13	44.50	47.71	44.55	45.06	47.23	
	25	42.39	40.16	47.48	49.47	46.65	46.94	47.13	44.50	47.71	44.55	45.06	48.07	
	26	43.49	40.85	46.11	48.80	47.65	47.42	48.34	44.84	47.65	44.10	45.41	48.44	
	27	41.61	40.49	48.20	49.66	49.36	48.27	46.00	46.65	47.01	43.92	44.01	48.44	
	28	48.14	46.86	44.57	46.77	44.10	45.49	47.89	44.92	47.99	42.66	42.73	46.71	
	29	49.41	49.78	45.75	47.58	45.27	49.53	47.89	49.41	46.77	42.66	40.88	50.10	
	30	48.04	47.58	46.96	48.82	46.86	48.98	47.17	46.60	46.86	42.66	41.68	48.37	
	31	46.25	44.61	45.49	47.32	46.20	46.96	50.10	47.37	48.45	42.32	43.15	47.48	
	32	49.78	49.29	46.71	48.98	46.20	46.76	46.41	45.44	46.50	41.64	43.15	47.06	
	33	50.09	48.35	50.84	52.80	49.84	43.66	46.82	47.06	51.15	47.01	47.42	49.47	
	34	50.46	48.72	47.89	49.78	46.55	43.71	49.43	49.66	53.03	47.48	47.48	50.27	
	35	48.87	47.58	48.31	49.35	47.37	42.17	49.43	47.95	50.77	46.25	45.05	49.10	
	36	49.72	47.58	47.58	50.30	48.72	44.61	51.22	51.02	52.28	47.68	49.35	47.32	
	37	51.71	49.50	47.94	50.67	49.93	45.75	51.59	51.84	53.57	48.45	50.58	49.66	
	38	50.58	48.40	45.66	47.90	46.37	42.02	49.60	47.73	51.84	47.68	49.04	48.14	
	39	50.09	48.35	44.92	47.53	45.62	42.05	49.23	47.37	51.46	47.32	48.68	47.78	
	40	51.71	50.35	44.84	48.26	46.33	43.11	47.84	50.21	51.77	48.45	48.56	50.21	
	41	49.35	47.22	45.31	47.53	45.23	42.73	51.29	50.64	51.33	48.04	47.32	48.51	
	42	47.49	46.65	46.91	48.77	47.22	45.84	46.71	48.20	48.45	46.10	43.83	46.55	
	43	47.49	49.09	49.41	48.77	47.22	46.35	49.72	47.99	52.04	49.41	50.27	47.99	

Matrix 1: Part 7

		73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
	44	45.97	47.53	51.77	51.10	48.67	49.04	49.72	48.72	51.46	49.29	49.29	53.05
	45	49.04	49.93	49.53	49.96	49.96	49.29	49.96	48.93	51.59	48.14	49.10	47.78
	46	48.63	49.50	49.53	49.96	49.96	49.29	49.96	48.93	51.59	48.14	49.10	47.78
	47	47.13	47.90	50.17	51.66	51.22	43.71	47.59	49.53	50.03	49.60	50.03	44.31
	48	47.13	47.09	48.01	51.22	50.33	42.94	48.14	49.23	48.01	48.86	47.17	44.31
	49	48.22	47.77	51.02	54.04	50.46	47.68	50.71	48.40	50.78	48.77	50.46	51.88
	50	39.67	40.00	46.10	45.54	45.23	51.81	49.23	49.90	49.19	44.77	43.38	50.09
	51	39.69	39.67	47.78	47.17	46.46	49.10	48.20	49.29	47.49	45.50	44.80	52.67
	52	45.23	45.97	48.74	49.04	47.78	46.94	47.69	49.65	46.05	45.65	47.00	47.95
	53	47.49	48.26	47.42	46.91	45.31	44.84	43.42	46.46	46.30	44.70	47.23	49.47
	54	45.35	44.14	48.56	50.46	48.45	47.89	45.59	48.01	49.53	45.09	47.01	47.89
	55	46.77	46.73	48.14	49.61	47.63	47.17	50.54	50.03	52.80	47.32	50.58	54.11
	56	46.86	45.23	46.50	49.61	47.63	46.76	47.23	47.17	49.10	44.70	45.89	50.47
	57	46.46	44.45	48.67	50.15	52.41	47.58	48.68	48.93	48.77	45.54	46.60	54.89
	58	44.88	44.45	46.91	47.53	46.41	45.05	44.79	45.05	47.32	43.07	45.19	49.78
	59	46.10	45.66	49.47	50.09	50.64	48.37	46.76	48.68	48.62	45.35	46.88	51.46
	60	46.10	45.66	49.47	50.09	50.64	48.37	46.76	48.68	48.62	45.35	46.88	51.46
	61	48.14	47.68	48.40	49.04	50.41	47.63	45.05	47.73	48.82	45.27	45.84	51.02
	62	46.15	46.10	47.53	47.45	48.67	44.18	44.40	44.65	47.32	44.61	46.41	51.08
	63	46.15	46.10	47.94	47.85	49.09	44.57	44.79	45.05	47.73	45.00	46.82	51.08
	64	46.15	45.70	50.15	49.93	50.90	44.57	43.53	43.79	45.54	42.63	43.92	49.78
	65	49.66	49.61	49.93	49.74	52.86	46.77	46.50	45.97	47.45	45.15	46.50	51.71
	66	47.94	46.69	50.30	50.95	51.48	46.91	48.82	49.50	51.16	48.31	46.46	51.33
	67	47.32	51.08	47.37	48.82	47.58	50.54	43.87	46.10	48.93	48.62	46.25	49.84
	68	45.54	44.35	47.37	46.77	45.27	42.39	45.75	45.70	46.06	44.57	45.66	45.00
	69	45.12	44.66	45.12	45.12	47.41	50.35	43.11	45.00	46.55	43.28	44.05	46.81
	70	46.05	45.59	45.62	46.01	46.73	46.77	43.45	44.88	47.95	43.76	46.30	48.72
	71	16.23	18.39	38.80	39.53	39.99	42.51	40.93	44.90	39.53	40.09	38.61	41.79
	72	16.80	17.87	41.45	41.84	42.34	43.24	41.35	45.37	41.35	40.79	40.04	43.86
	73	0.00	5.88	40.32	40.69	40.42	44.43	46.00	48.68	40.23	40.52	39.76	43.33
	74		0.00	40.37	42.28	41.23	43.29	47.20	49.49	42.84	41.23	39.72	44.65
	75			0.00	4.31	4.95	25.17	36.42	34.86	35.90	30.93	34.31	32.87
	76				0.00	5.83	26.97	37.57	35.97	36.65	29.93	34.31	34.26
	77					0.00	24.16	37.57	35.97	35.90	31.38	35.03	33.21
	78						0.00	33.65	32.54	34.01	32.83	33.77	28.87
	79							0.00	8.56	25.41	25.41	27.34	30.45
	80								0.00	27.07	25.46	26.31	31.75
	81									0.00	10.37	14.25	32.38
	82										0.00	13.45	32.25
	83											0.00	31.46
	84												0.00

Matrix 1: Part 8

	85	86	..
1	46.12	54.82	
2	46.97	56.41	
3	43.50	58.99	
4	46.65	52.67	
5	47.99	56.49	
6	48.43	56.72	
7	48.83	56.72	
8	49.28	56.16	
9	50.07	56.72	
10	48.13	57.79	
11	45.73	58.20	
12	45.73	58.20	
13	45.76	57.62	
14	45.41	57.70	
15	46.51	59.53	
16	46.45	61.22	
17	45.75	58.75	
18	49.20	55.53	
19	46.87	55.37	
20	49.78	58.44	
21	49.35	58.44	
22	46.25	57.30	
23	46.25	57.78	
24	46.30	56.89	
25	46.30	58.19	
26	50.33	59.95	
27	48.51	59.77	
28	44.92	53.19	
29	46.33	55.47	

Matrix 1: Part 8

	85	86	..
30	46.10	58.69	
31	44.10	57.63	
32	44.73	55.40	
33	47.01	59.95	
34	45.47	57.86	
35	47.05	56.56	
36	45.08	58.52	
37	47.33	57.45	
38	46.57	56.56	
39	46.54	56.49	
40	47.41	56.16	
41	48.13	58.44	
42	44.67	58.94	
43	48.06	54.61	
44	46.15	59.77	
45	48.09	64.23	
46	47.68	63.68	
47	47.33	55.94	
48	45.47	55.00	
49	47.99	56.49	
50	49.66	56.98	
51	48.04	58.07	
52	46.10	58.03	
53	43.34	57.45	
54	49.46	57.62	
55	48.87	56.97	
56	50.03	55.40	
57	48.87	60.67	
58	47.01	58.11	

Matrix 1: Part 8

	85	86	..
59	46.45	57.70	
60	46.45	57.70	
61	48.03	57.70	
62	48.87	65.04	
63	48.46	65.61	
64	47.01	62.48	
65	49.78	62.80	
66	47.63	56.24	
67	48.67	57.05	
68	47.37	55.61	
69	48.80	63.57	
70	47.78	65.58	
71	44.55	63.59	
72	44.10	64.85	
73	44.50	61.12	
74	46.05	61.00	
75	47.58	55.73	
76	46.86	54.70	
77	49.14	55.87	
78	49.29	58.24	
79	46.61	64.68	
80	48.91	63.49	
81	49.46	63.56	
82	48.22	59.44	
83	45.90	59.44	
84	45.47	59.35	
85	0.00	60.55	
86		0.00	

7.2. Homologiematrix von N^{pro}-Gen Sequenzen

1 Gi-4	49 G-AU
2 Gi-5	50 S10
3 Gi-7	51 3-It
4 Gi-6	52 S14-1
5 Soldan	53 26-F
6 ED	54 Deer-NZ1
7 Antilope-1	55 519
8 890	56 Buffalo-A1
9 C413	57 C79
10 Parker	58 SD-1
11 12524	59 Paplitz
12 Gi-2	60 Oregon
13 18605	61 C86
14 3709	62 700097
15 659	63 221
16 2230	64 NADL
17 653	65 Singer
18 SCP	66 200085
19 28508-5	67 Deer-GB1
20 287-7KH	68 2313-UK
21 871	69 PG2
22 14652	70 Giraffe-1
23 14657	71 Alfort-T
24 14658	72 Schweinf
25 19371	73 Glentorf
26 22531	74 C-strain
27 721	75 AZ79
28 K7-00	76 Reindeer-1
29 CP7	77 17385
30 5785ncp	78 466
31 RIT	79 137-4
32 NewYork-1	80 V2536
33 18602	81 BD-31
34 Goat-G1	82 L83-84
35 5273-2	83 X818
36 14816	84 Gifhorn
37 S14-2	85 Hobi
38 22424	86 Pronghorn-antelope
39 4478	
40 Osloss	
41 Antilope-G2	
42 387KH	
43 A-AU	
44 L-AU	
45 10558	
46 11468	
47 J-AU	
48 W-AU	

Similarity Matrix Part: 1

[illegible]

Similarity Matrix Part: 2

[illegible]

Similarity Matrix Part: 3

	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
1	0.6687	0.6687	0.6825	0.6726	0.6627	0.6647	0.6627	0.6766	0.6687	0.6746	0.6766	0.6667
2	0.6825	0.6746	0.6865	0.6925	0.6845	0.6845	0.6806	0.6925	0.6825	0.6825	0.6885	0.6806
3	0.6885	0.6845	0.6925	0.6845	0.6766	0.6806	0.6865	0.6885	0.6766	0.6825	0.6806	0.6806
4	0.6984	0.6944	0.7004	0.6766	0.6726	0.6687	0.6667	0.6825	0.6687	0.6726	0.6667	0.6706
5	0.6786	0.6766	0.6786	0.6825	0.6766	0.6786	0.6726	0.6806	0.6865	0.6825	0.6845	0.6905
6	0.6944	0.6925	0.6925	0.6885	0.7004	0.6944	0.7024	0.7004	0.7004	0.7024	0.7063	0.7103
7	0.6944	0.6925	0.6925	0.6885	0.7004	0.6944	0.7024	0.7004	0.7004	0.7024	0.7063	0.7103
8	0.6905	0.6885	0.6905	0.7044	0.7024	0.6964	0.7063	0.7024	0.7024	0.7083	0.7163	0.7183
9	0.6964	0.6944	0.6925	0.6964	0.7004	0.6984	0.7063	0.7004	0.7024	0.7044	0.7163	0.7103
10	0.6944	0.6885	0.6825	0.6984	0.7004	0.6944	0.7024	0.7083	0.7063	0.7083	0.7123	0.7143
11	0.7004	0.6925	0.6944	0.6885	0.6984	0.7004	0.7024	0.7024	0.6944	0.6944	0.7004	0.6984
12	0.7004	0.6925	0.6944	0.6885	0.6984	0.7004	0.7024	0.7024	0.6944	0.6944	0.7004	0.6984
13	0.7004	0.6925	0.6944	0.6905	0.6964	0.6984	0.7004	0.7004	0.6925	0.6925	0.6984	0.6964
14	0.7024	0.6944	0.6964	0.6865	0.6984	0.7004	0.7024	0.7024	0.6944	0.6944	0.7004	0.6984
15	0.6964	0.6885	0.6905	0.6825	0.6925	0.6944	0.6964	0.6964	0.6885	0.6885	0.6944	0.6925
16	0.6925	0.6845	0.6925	0.6825	0.6905	0.6944	0.6925	0.6925	0.6885	0.6885	0.6944	0.6925
17	0.6944	0.6865	0.6885	0.6825	0.6944	0.6964	0.6984	0.6964	0.6885	0.6885	0.6944	0.6944
18	0.6905	0.6806	0.6766	0.6925	0.6964	0.6905	0.6964	0.6964	0.6925	0.6984	0.6964	0.6944
19	0.6984	0.6944	0.6865	0.6845	0.6845	0.6905	0.6885	0.6825	0.6964	0.6984	0.7063	0.7044
20	0.9226	0.9226	0.9246	0.7679	0.7976	0.7778	0.7976	0.7738	0.7897	0.7817	0.7857	0.7817
21	0.9325	0.9306	0.9127	0.7778	0.8075	0.7917	0.8036	0.7956	0.8115	0.8036	0.8036	0.7937
22	0.9940	0.9425	0.9127	0.7758	0.7956	0.7837	0.7956	0.7837	0.7976	0.7897	0.7976	0.7877
23	0.9921	0.9405	0.9107	0.7738	0.7937	0.7817	0.7937	0.7817	0.7996	0.7917	0.7996	0.7857
24	0.9921	0.9405	0.9107	0.7738	0.7937	0.7817	0.7937	0.7817	0.7956	0.7877	0.7976	0.7877
25	1.0000	0.9365	0.9067	0.7738	0.7937	0.7817	0.7937	0.7817	0.7956	0.7877	0.7956	0.7857
26		1.0000	0.9226	0.7718	0.7917	0.7718	0.7857	0.7778	0.7798	0.7778	0.7837	0.7738
27			1.0000	0.7579	0.7798	0.7718	0.7857	0.7738	0.7718	0.7679	0.7758	0.7659
28				1.0000	0.9365	0.9226	0.9226	0.9127	0.8611	0.8710	0.8591	0.8710
29					1.0000	0.9385	0.9306	0.9286	0.8710	0.8750	0.8651	0.8710
30						1.0000	0.9484	0.9325	0.8750	0.8790	0.8770	0.8770
31							1.0000	0.9345	0.8710	0.8770	0.8690	0.8710
32								1.0000	0.8790	0.8849	0.8730	0.8710
33									1.0000	0.9722	0.9563	0.9206
34										1.0000	0.9563	0.9167
35											1.0000	0.9206
36												1.0000

Similarity Matrix Part: 4

	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	..
1	0.6587	0.6627	0.6647	0.6706	0.6647	0.6647	0.6925	0.6825	0.6845	0.6865	0.7063	0.6984	
2	0.6766	0.6746	0.6766	0.6925	0.6865	0.6845	0.7024	0.6944	0.6964	0.6984	0.7103	0.7123	
3	0.6806	0.6687	0.6706	0.6885	0.6806	0.6806	0.6984	0.6845	0.6845	0.6865	0.7103	0.7083	
4	0.6647	0.6587	0.6627	0.6786	0.6687	0.6726	0.6984	0.6905	0.6726	0.6746	0.6885	0.6984	
5	0.6786	0.6746	0.6766	0.6925	0.6865	0.6786	0.6925	0.6925	0.6905	0.6905	0.7083	0.7183	
6	0.6964	0.6865	0.6905	0.7083	0.6925	0.7063	0.7004	0.6905	0.6964	0.6944	0.7103	0.7004	
7	0.6964	0.6865	0.6905	0.7083	0.6925	0.7063	0.7004	0.6905	0.6964	0.6944	0.7103	0.7004	
8	0.7024	0.7004	0.7044	0.7143	0.7063	0.7103	0.7063	0.6984	0.7083	0.7063	0.7183	0.7044	
9	0.6944	0.6944	0.6984	0.7063	0.7004	0.7063	0.7004	0.6885	0.6984	0.6964	0.7163	0.7063	
10	0.7024	0.6905	0.6944	0.7083	0.7044	0.7063	0.7024	0.6944	0.7044	0.7063	0.7083	0.6944	
11	0.6885	0.6845	0.6865	0.7044	0.6925	0.6964	0.7123	0.7044	0.7044	0.7063	0.7183	0.7044	
12	0.6885	0.6845	0.6865	0.7044	0.6925	0.6964	0.7123	0.7044	0.7044	0.7063	0.7183	0.7044	
13	0.6865	0.6865	0.6885	0.7024	0.6905	0.6944	0.7083	0.7004	0.7004	0.7024	0.7183	0.7044	
14	0.6885	0.6845	0.6865	0.7044	0.6925	0.6964	0.7083	0.7004	0.7004	0.7024	0.7183	0.7044	
15	0.6825	0.6786	0.6806	0.6984	0.6865	0.6905	0.7044	0.6964	0.6964	0.6984	0.7143	0.7004	
16	0.6825	0.6825	0.6845	0.6984	0.6865	0.6885	0.6964	0.6885	0.6905	0.6925	0.7103	0.6964	
17	0.6845	0.6786	0.6806	0.7004	0.6885	0.6925	0.7024	0.6944	0.6964	0.6964	0.7123	0.7004	
18	0.6865	0.6885	0.6845	0.6984	0.6885	0.6944	0.7024	0.6944	0.6984	0.7004	0.7083	0.7004	
19	0.6944	0.7024	0.7024	0.7083	0.6885	0.7024	0.6984	0.6905	0.7044	0.7063	0.7103	0.7024	
20	0.7778	0.7937	0.7937	0.7917	0.7837	0.7996	0.7758	0.7837	0.7679	0.7659	0.7738	0.7679	
21	0.7897	0.7996	0.7996	0.8036	0.7937	0.7996	0.7837	0.7976	0.7698	0.7679	0.7897	0.7837	
22	0.7877	0.7976	0.7976	0.7937	0.7837	0.7937	0.8115	0.8095	0.7778	0.7798	0.7758	0.7738	
23	0.7857	0.7956	0.7956	0.7917	0.7817	0.7917	0.8135	0.8115	0.7758	0.7778	0.7778	0.7758	
24	0.7877	0.7976	0.7976	0.7937	0.7837	0.7937	0.8095	0.8075	0.7758	0.7778	0.7738	0.7718	
25	0.7857	0.7956	0.7956	0.7917	0.7817	0.7956	0.8095	0.8075	0.7778	0.7798	0.7738	0.7718	
26	0.7718	0.7798	0.7798	0.7738	0.7817	0.7837	0.7877	0.7857	0.7659	0.7679	0.7619	0.7639	
27	0.7540	0.7798	0.7798	0.7738	0.7738	0.7937	0.7619	0.7738	0.7659	0.7679	0.7738	0.7639	
28	0.8671	0.8730	0.8770	0.8730	0.8730	0.8591	0.7897	0.7877	0.7877	0.7897	0.7976	0.7778	
29	0.8730	0.8710	0.8750	0.8889	0.8770	0.8750	0.8056	0.8135	0.7976	0.7956	0.8016	0.7937	
30	0.8730	0.8671	0.8710	0.8810	0.8810	0.8730	0.7857	0.7917	0.7917	0.7897	0.8056	0.7956	
31	0.8690	0.8730	0.8730	0.8770	0.8869	0.8730	0.7897	0.7917	0.7857	0.7837	0.8056	0.7798	
32	0.8710	0.8651	0.8690	0.8790	0.8730	0.8730	0.7798	0.7897	0.7837	0.7857	0.8155	0.7996	
33	0.9167	0.9147	0.9187	0.9226	0.9028	0.8948	0.7857	0.7897	0.7758	0.7738	0.7996	0.8036	
34	0.9127	0.9107	0.9147	0.9206	0.9048	0.8948	0.7857	0.7897	0.7718	0.7698	0.8016	0.7956	
35	0.9167	0.9187	0.9226	0.9266	0.9127	0.9008	0.7917	0.7877	0.7698	0.7679	0.7996	0.7996	
36	0.9643	0.9425	0.9464	0.9444	0.9266	0.9226	0.8056	0.7996	0.7877	0.7857	0.8115	0.8115	
37	1.0000	0.9385	0.9425	0.9444	0.9266	0.9187	0.7956	0.7937	0.7837	0.7817	0.7976	0.8016	
38		1.0000	0.9960	0.9504	0.9246	0.9187	0.8056	0.8036	0.7758	0.7738	0.8016	0.7956	
39			1.0000	0.9544	0.9286	0.9206	0.8036	0.8016	0.7778	0.7758	0.8056	0.7996	
40				1.0000	0.9425	0.9286	0.7956	0.7937	0.7857	0.7837	0.8016	0.7956	
41					1.0000	0.9167	0.7837	0.7837	0.7758	0.7738	0.7976	0.7917	

Similarity Matrix Part: 4

	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
42						1.0000	0.7877	0.7857	0.7639	0.7619	0.7837	0.7857
43							1.0000	0.9444	0.8433	0.8452	0.8413	0.8532
44								1.0000	0.8333	0.8353	0.8333	0.8452
45									1.0000	0.9980	0.8611	0.8492
46										1.0000	0.8631	0.8472
47											1.0000	0.9107
48												1.0000

Similarity Matrix Part: 5

	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1	0.6508	0.6944	0.7044	0.6726	0.6944	0.6786	0.6647	0.6548	0.6806	0.6865	0.6806	0.6806
2	0.6667	0.7004	0.7123	0.6746	0.6925	0.6925	0.6806	0.6726	0.6964	0.7004	0.6905	0.6905
3	0.6687	0.6825	0.6964	0.6825	0.7024	0.6746	0.6567	0.6508	0.6825	0.6925	0.6885	0.6885
4	0.6627	0.6925	0.7063	0.6786	0.6885	0.6726	0.6528	0.6508	0.6687	0.6845	0.6667	0.6667
5	0.6766	0.6865	0.6905	0.6667	0.6806	0.6627	0.6667	0.6627	0.6825	0.6964	0.6786	0.6786
6	0.6845	0.7123	0.6964	0.6925	0.6944	0.6766	0.6726	0.6687	0.6964	0.6925	0.6865	0.6865
7	0.6845	0.7123	0.6964	0.6925	0.6944	0.6766	0.6726	0.6687	0.6964	0.6925	0.6865	0.6865
8	0.6905	0.7123	0.7083	0.6984	0.6964	0.6885	0.6786	0.6786	0.6964	0.7004	0.6825	0.6825
9	0.6766	0.7063	0.7024	0.6925	0.7004	0.6865	0.6766	0.6766	0.6905	0.6944	0.6845	0.6845
10	0.6786	0.7024	0.7024	0.6865	0.6925	0.6885	0.6746	0.6726	0.6825	0.6845	0.6766	0.6766
11	0.6806	0.7044	0.6984	0.6925	0.7083	0.6746	0.6706	0.6667	0.6905	0.6925	0.6865	0.6865
12	0.6806	0.7044	0.6984	0.6925	0.7083	0.6746	0.6706	0.6667	0.6905	0.6925	0.6865	0.6865
13	0.6766	0.7004	0.6944	0.6885	0.7044	0.6726	0.6687	0.6627	0.6865	0.6885	0.6825	0.6825
14	0.6786	0.7024	0.6964	0.6905	0.7063	0.6746	0.6706	0.6647	0.6865	0.6885	0.6825	0.6825
15	0.6726	0.6964	0.6905	0.6845	0.7004	0.6687	0.6647	0.6587	0.6825	0.6845	0.6786	0.6786
16	0.6647	0.6885	0.6825	0.6766	0.6944	0.6667	0.6627	0.6567	0.6806	0.6825	0.6726	0.6726
17	0.6726	0.6964	0.6885	0.6845	0.7004	0.6667	0.6647	0.6607	0.6845	0.6865	0.6806	0.6806
18	0.6786	0.6885	0.6845	0.6845	0.7004	0.6706	0.6627	0.6548	0.6806	0.6905	0.6845	0.6845
19	0.6905	0.7063	0.7202	0.6885	0.7103	0.6786	0.6706	0.6726	0.6905	0.6885	0.6845	0.6845
20	0.7917	0.8075	0.7937	0.7679	0.7778	0.7956	0.7937	0.7877	0.8075	0.8036	0.7976	0.7976
21	0.7996	0.8095	0.7897	0.7698	0.7798	0.7937	0.7877	0.7897	0.8016	0.8095	0.7917	0.7917
22	0.7917	0.8056	0.7956	0.7718	0.7877	0.7956	0.7897	0.8056	0.7897	0.7937	0.7877	0.7877
23	0.7897	0.8075	0.7976	0.7738	0.7897	0.7937	0.7917	0.8036	0.7917	0.7917	0.7857	0.7857
24	0.7917	0.8036	0.7937	0.7718	0.7877	0.7956	0.7897	0.8056	0.7877	0.7917	0.7877	0.7877
25	0.7937	0.8075	0.7937	0.7698	0.7817	0.7937	0.7877	0.8036	0.7917	0.7956	0.7897	0.7897
26	0.7937	0.7976	0.7817	0.7718	0.7778	0.7897	0.7857	0.7917	0.7996	0.7937	0.7817	0.7817
27	0.7798	0.8016	0.7897	0.7679	0.7798	0.7798	0.7718	0.7738	0.7937	0.7976	0.7778	0.7778
28	0.7996	0.7917	0.7837	0.7560	0.7817	0.7857	0.7778	0.8095	0.7976	0.8075	0.7976	0.7976

Similarity Matrix Part: 5

		49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
	29		0.8036	0.8194	0.8016	0.7877	0.8036	0.7976	0.8056	0.8254	0.8115	0.8194	0.8155	0.8155
	30		0.7956	0.8115	0.7996	0.7738	0.7897	0.7956	0.7937	0.8135	0.8115	0.8095	0.8095	0.8095
	31		0.8095	0.8155	0.8036	0.7778	0.7917	0.7937	0.7996	0.8135	0.8234	0.8155	0.8115	0.8115
	32		0.8056	0.8075	0.7996	0.7758	0.7837	0.7917	0.7976	0.8095	0.7956	0.7976	0.7996	0.7996
	33		0.8036	0.8115	0.7976	0.7817	0.7996	0.8175	0.8254	0.8155	0.8056	0.8056	0.8075	0.8075
	34		0.8056	0.8095	0.7956	0.7837	0.8056	0.8155	0.8254	0.8155	0.8016	0.8016	0.8056	0.8056
	35		0.7976	0.8095	0.8056	0.7857	0.8056	0.8135	0.8274	0.8194	0.8016	0.7956	0.7976	0.7976
	36		0.8056	0.8194	0.7897	0.7798	0.7917	0.8036	0.8135	0.8175	0.7976	0.8056	0.8075	0.8075
	37		0.7956	0.8075	0.7897	0.7778	0.7917	0.7897	0.8016	0.8075	0.7937	0.7996	0.7976	0.7976
	38		0.7956	0.8056	0.7857	0.7778	0.7956	0.8075	0.8175	0.8194	0.8075	0.8095	0.8036	0.8036
	39		0.7956	0.8075	0.7877	0.7798	0.7976	0.8095	0.8155	0.8234	0.8056	0.8115	0.8056	0.8056
	40		0.8036	0.8056	0.7937	0.7917	0.8075	0.8095	0.8155	0.8214	0.8115	0.8135	0.8175	0.8175
	41		0.7996	0.8115	0.7976	0.7758	0.7897	0.7976	0.8075	0.8155	0.8155	0.8115	0.8075	0.8075
	42		0.7956	0.8274	0.8036	0.7778	0.7857	0.7996	0.8135	0.8075	0.7877	0.7877	0.7996	0.7996
	43		0.8135	0.8115	0.8056	0.7956	0.8175	0.8155	0.8155	0.8135	0.8194	0.8175	0.8115	0.8115
	44		0.8075	0.8056	0.7937	0.7937	0.8075	0.8075	0.8115	0.8036	0.8135	0.8175	0.8075	0.8075
	45		0.8115	0.7976	0.7837	0.7956	0.7937	0.7857	0.7659	0.7817	0.8036	0.8194	0.8095	0.8095
	46		0.8135	0.7956	0.7857	0.7937	0.7917	0.7877	0.7679	0.7817	0.8016	0.8175	0.8075	0.8075
	47		0.8175	0.7996	0.8056	0.8016	0.8095	0.7976	0.7758	0.7897	0.8095	0.8155	0.8095	0.8095
	48		0.8075	0.7917	0.7857	0.7897	0.7996	0.7897	0.7837	0.7956	0.8056	0.8115	0.8095	0.8095
	49		1.0000	0.7937	0.7817	0.7897	0.7976	0.7897	0.7817	0.7976	0.8274	0.8234	0.8075	0.8075
	50			1.0000	0.9325	0.8353	0.8373	0.8175	0.8075	0.8056	0.8294	0.8373	0.8234	0.8234
	51				1.0000	0.8274	0.8313	0.8036	0.7937	0.7897	0.8135	0.8175	0.8016	0.8016
	52					1.0000	0.9266	0.7798	0.7837	0.7798	0.7877	0.7996	0.8036	0.8036
	53						1.0000	0.7937	0.7996	0.8016	0.8036	0.8155	0.8254	0.8254
	54							1.0000	0.9226	0.9147	0.8214	0.8472	0.8373	0.8373
	55								1.0000	0.8968	0.8413	0.8373	0.8353	0.8353
	56									1.0000	0.8333	0.8532	0.8452	0.8452
	57										1.0000	0.9206	0.9107	0.9107
	58											1.0000	0.9167	0.9167
	59												1.0000	1.0000
	60													1.0000

Similarity Matrix Part: 6

	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	..
1	0.6885	0.6647	0.6647	0.6667	0.6687	0.6806	0.6865	0.6885	0.6667	0.6627	0.6667	0.6607	
2	0.7063	0.6925	0.6925	0.6885	0.6786	0.6905	0.7063	0.6925	0.6528	0.6528	0.6687	0.6647	
3	0.6845	0.6726	0.6726	0.6766	0.6746	0.6845	0.7024	0.6944	0.6627	0.6687	0.6647	0.6607	
4	0.6766	0.6706	0.6706	0.6647	0.6627	0.6706	0.7004	0.6944	0.6766	0.6825	0.6647	0.6627	
5	0.6944	0.6905	0.6905	0.6885	0.6865	0.6944	0.6905	0.7044	0.6567	0.6627	0.6508	0.6508	
6	0.6944	0.6766	0.6766	0.6647	0.6687	0.6726	0.6984	0.6905	0.6806	0.6607	0.6607	0.6548	
7	0.6944	0.6766	0.6766	0.6647	0.6687	0.6726	0.6984	0.6905	0.6786	0.6627	0.6587	0.6528	
8	0.6964	0.6944	0.6944	0.6746	0.6706	0.6865	0.6964	0.6944	0.6687	0.6508	0.6567	0.6587	
9	0.6984	0.6865	0.6865	0.6746	0.6687	0.6845	0.6865	0.6845	0.6667	0.6468	0.6567	0.6587	
10	0.6845	0.6766	0.6766	0.6607	0.6548	0.6746	0.6865	0.6806	0.6607	0.6508	0.6607	0.6627	
11	0.6865	0.6845	0.6845	0.6746	0.6706	0.6865	0.7063	0.7024	0.6587	0.6627	0.6825	0.6746	
12	0.6865	0.6845	0.6845	0.6746	0.6706	0.6865	0.7063	0.7024	0.6587	0.6627	0.6825	0.6746	
13	0.6825	0.6806	0.6806	0.6706	0.6667	0.6845	0.7024	0.6984	0.6607	0.6627	0.6825	0.6746	
14	0.6825	0.6806	0.6806	0.6706	0.6667	0.6865	0.7044	0.7004	0.6587	0.6647	0.6845	0.6766	
15	0.6786	0.6766	0.6766	0.6667	0.6627	0.6806	0.6984	0.6944	0.6528	0.6567	0.6786	0.6706	
16	0.6766	0.6746	0.6746	0.6647	0.6607	0.6786	0.6964	0.6905	0.6548	0.6567	0.6746	0.6667	
17	0.6806	0.6786	0.6786	0.6687	0.6647	0.6786	0.6964	0.6944	0.6548	0.6567	0.6786	0.6706	
18	0.6766	0.6687	0.6687	0.6687	0.6567	0.6806	0.6905	0.6865	0.6349	0.6448	0.6528	0.6448	
19	0.6885	0.6766	0.6766	0.6766	0.6706	0.6944	0.7044	0.6964	0.6429	0.6528	0.6746	0.6885	
20	0.8095	0.7917	0.7917	0.8056	0.8056	0.7857	0.7817	0.7897	0.6766	0.6726	0.6726	0.6845	
21	0.8075	0.7937	0.7937	0.8036	0.8095	0.7956	0.8075	0.7956	0.6746	0.6627	0.6726	0.6806	
22	0.7937	0.7877	0.7877	0.7976	0.7976	0.7877	0.8036	0.7877	0.6726	0.6647	0.6667	0.6766	
23	0.7917	0.7857	0.7857	0.7956	0.7956	0.7857	0.8016	0.7897	0.6726	0.6647	0.6667	0.6766	
24	0.7917	0.7857	0.7857	0.7956	0.7956	0.7857	0.8016	0.7877	0.6746	0.6667	0.6667	0.6766	
25	0.7956	0.7897	0.7897	0.7996	0.7956	0.7857	0.8056	0.7857	0.6726	0.6687	0.6706	0.6806	
26	0.7897	0.7817	0.7778	0.8056	0.8056	0.7877	0.7937	0.7758	0.6627	0.6706	0.6607	0.6726	
27	0.7917	0.7758	0.7718	0.7996	0.7956	0.7897	0.7976	0.7738	0.6746	0.6647	0.6706	0.6845	
28	0.8056	0.7857	0.7877	0.7857	0.7798	0.7897	0.7976	0.7778	0.6567	0.6825	0.6429	0.6488	
29	0.8294	0.8016	0.7996	0.7976	0.7917	0.8036	0.8194	0.7837	0.6567	0.6825	0.6468	0.6528	
30	0.8155	0.7897	0.7877	0.7877	0.7817	0.7976	0.8214	0.7837	0.6667	0.6726	0.6429	0.6567	
31	0.8135	0.7937	0.7976	0.7996	0.7976	0.8056	0.8175	0.7877	0.6607	0.6806	0.6508	0.6587	
32	0.8036	0.7837	0.7817	0.7798	0.7738	0.7996	0.8294	0.8016	0.6587	0.6726	0.6468	0.6567	
33	0.8115	0.7996	0.8016	0.8036	0.7917	0.8036	0.8075	0.7877	0.6567	0.6726	0.6508	0.6548	
34	0.8155	0.7937	0.7917	0.7937	0.7817	0.7996	0.8056	0.7917	0.6567	0.6687	0.6468	0.6528	
35	0.8095	0.7956	0.7976	0.7917	0.7817	0.8075	0.8036	0.7877	0.6488	0.6647	0.6448	0.6528	
36	0.7996	0.7897	0.7897	0.8036	0.7897	0.7857	0.8075	0.7857	0.6647	0.6726	0.6528	0.6548	
37	0.7877	0.7877	0.7877	0.7917	0.7798	0.7817	0.8075	0.7659	0.6607	0.6687	0.6429	0.6448	
38	0.8095	0.7976	0.7976	0.8095	0.7976	0.8016	0.8016	0.7877	0.6647	0.6706	0.6508	0.6548	
39	0.8115	0.7996	0.7996	0.8115	0.7996	0.8036	0.8036	0.7897	0.6667	0.6726	0.6508	0.6548	
40	0.8135	0.7996	0.7996	0.8036	0.7937	0.8016	0.8214	0.7897	0.6726	0.6845	0.6488	0.6528	
41	0.8095	0.8075	0.8036	0.8115	0.7996	0.7956	0.8016	0.7837	0.6548	0.6726	0.6508	0.6548	

Similarity Matrix Part: 7

	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	..
1	0.6746	0.6667	0.6766	0.6746	0.6627	0.6567	0.6607	0.6409	0.6310	0.6290	0.6647	0.6528	
2	0.6726	0.6647	0.6726	0.6726	0.6667	0.6448	0.6488	0.6250	0.6310	0.6190	0.6548	0.6448	
3	0.6667	0.6627	0.6706	0.6706	0.6647	0.6488	0.6726	0.6448	0.6349	0.6270	0.6488	0.6528	
4	0.6667	0.6627	0.6706	0.6627	0.6687	0.6548	0.6607	0.6389	0.6329	0.6290	0.6587	0.6448	
5	0.6587	0.6647	0.6508	0.6548	0.6548	0.6528	0.6627	0.6429	0.6409	0.6369	0.6508	0.6528	
6	0.6706	0.6607	0.6607	0.6528	0.6409	0.6310	0.6548	0.6468	0.6210	0.6409	0.6488	0.6508	
7	0.6687	0.6587	0.6587	0.6508	0.6389	0.6290	0.6567	0.6488	0.6230	0.6389	0.6508	0.6528	
8	0.6726	0.6647	0.6548	0.6548	0.6409	0.6349	0.6488	0.6508	0.6151	0.6409	0.6508	0.6508	
9	0.6687	0.6607	0.6587	0.6528	0.6468	0.6389	0.6508	0.6488	0.6210	0.6468	0.6528	0.6567	
10	0.6687	0.6647	0.6528	0.6488	0.6409	0.6409	0.6548	0.6448	0.6131	0.6448	0.6548	0.6468	
11	0.6687	0.6567	0.6448	0.6488	0.6488	0.6290	0.6488	0.6389	0.6230	0.6290	0.6448	0.6429	
12	0.6687	0.6567	0.6448	0.6488	0.6488	0.6290	0.6488	0.6389	0.6230	0.6290	0.6448	0.6429	
13	0.6667	0.6548	0.6468	0.6508	0.6508	0.6310	0.6448	0.6389	0.6250	0.6310	0.6468	0.6409	
14	0.6687	0.6567	0.6448	0.6488	0.6488	0.6290	0.6488	0.6389	0.6230	0.6290	0.6448	0.6429	
15	0.6627	0.6508	0.6389	0.6429	0.6429	0.6230	0.6409	0.6310	0.6171	0.6230	0.6389	0.6369	
16	0.6607	0.6508	0.6389	0.6389	0.6369	0.6210	0.6409	0.6310	0.6190	0.6210	0.6448	0.6369	
17	0.6627	0.6508	0.6429	0.6468	0.6468	0.6270	0.6448	0.6349	0.6210	0.6270	0.6429	0.6409	
18	0.6528	0.6508	0.6488	0.6548	0.6587	0.6349	0.6488	0.6349	0.6131	0.6270	0.6389	0.6488	
19	0.6786	0.6746	0.6548	0.6567	0.6508	0.6468	0.6567	0.6468	0.6052	0.6151	0.6389	0.6409	
20	0.6746	0.6825	0.6508	0.6409	0.6468	0.6567	0.6567	0.6627	0.6528	0.6687	0.6548	0.6468	
21	0.6706	0.6746	0.6567	0.6389	0.6508	0.6488	0.6587	0.6667	0.6548	0.6667	0.6627	0.6567	
22	0.6726	0.6845	0.6567	0.6429	0.6567	0.6587	0.6548	0.6667	0.6508	0.6667	0.6647	0.6528	
23	0.6726	0.6845	0.6567	0.6429	0.6567	0.6587	0.6548	0.6667	0.6508	0.6667	0.6647	0.6528	
24	0.6726	0.6845	0.6567	0.6429	0.6567	0.6607	0.6567	0.6687	0.6528	0.6687	0.6667	0.6548	
25	0.6786	0.6905	0.6528	0.6429	0.6567	0.6567	0.6567	0.6687	0.6528	0.6687	0.6667	0.6508	
26	0.6726	0.6865	0.6607	0.6468	0.6528	0.6548	0.6508	0.6667	0.6528	0.6706	0.6647	0.6488	
27	0.6825	0.6885	0.6508	0.6429	0.6448	0.6508	0.6607	0.6567	0.6548	0.6706	0.6706	0.6488	
28	0.6488	0.6548	0.6667	0.6548	0.6687	0.6627	0.6508	0.6647	0.6488	0.6766	0.6766	0.6567	
29	0.6429	0.6409	0.6607	0.6508	0.6627	0.6429	0.6508	0.6429	0.6548	0.6766	0.6865	0.6409	
30	0.6488	0.6508	0.6548	0.6448	0.6548	0.6448	0.6548	0.6567	0.6548	0.6766	0.6825	0.6488	
31	0.6587	0.6667	0.6627	0.6528	0.6587	0.6548	0.6409	0.6528	0.6468	0.6786	0.6746	0.6528	
32	0.6409	0.6429	0.6567	0.6448	0.6587	0.6567	0.6587	0.6627	0.6567	0.6825	0.6746	0.6548	
33	0.6389	0.6468	0.6369	0.6270	0.6409	0.6726	0.6567	0.6548	0.6349	0.6548	0.6528	0.6429	
34	0.6369	0.6448	0.6508	0.6409	0.6567	0.6726	0.6448	0.6429	0.6270	0.6528	0.6528	0.6389	
35	0.6448	0.6508	0.6488	0.6429	0.6528	0.6806	0.6448	0.6508	0.6369	0.6587	0.6647	0.6448	
36	0.6409	0.6508	0.6508	0.6369	0.6448	0.6667	0.6349	0.6349	0.6290	0.6508	0.6429	0.6528	
37	0.6310	0.6409	0.6488	0.6349	0.6389	0.6607	0.6329	0.6310	0.6230	0.6468	0.6369	0.6409	
38	0.6369	0.6468	0.6607	0.6488	0.6567	0.6806	0.6429	0.6508	0.6310	0.6508	0.6448	0.6488	
39	0.6389	0.6468	0.6647	0.6508	0.6607	0.6806	0.6448	0.6528	0.6329	0.6528	0.6468	0.6508	
40	0.6310	0.6369	0.6647	0.6468	0.6567	0.6746	0.6508	0.6389	0.6310	0.6468	0.6468	0.6389	

Similarity Matrix Part: 7

		73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
	41	0.6429	0.6528	0.6627	0.6508	0.6627	0.6766	0.6349	0.6369	0.6329	0.6488	0.6528	0.6468
	42	0.6508	0.6548	0.6548	0.6448	0.6528	0.6607	0.6567	0.6488	0.6468	0.6587	0.6706	0.6567
	43	0.6508	0.6429	0.6429	0.6448	0.6528	0.6587	0.6409	0.6488	0.6310	0.6429	0.6389	0.6488
	44	0.6587	0.6508	0.6310	0.6329	0.6448	0.6448	0.6409	0.6448	0.6329	0.6429	0.6429	0.6250
	45	0.6429	0.6389	0.6429	0.6409	0.6409	0.6448	0.6409	0.6448	0.6329	0.6488	0.6448	0.6508
	46	0.6448	0.6409	0.6429	0.6409	0.6409	0.6448	0.6409	0.6448	0.6329	0.6488	0.6448	0.6508
	47	0.6528	0.6488	0.6409	0.6329	0.6349	0.6706	0.6528	0.6429	0.6389	0.6409	0.6389	0.6687
	48	0.6528	0.6528	0.6508	0.6349	0.6389	0.6766	0.6508	0.6448	0.6508	0.6468	0.6548	0.6687
	49	0.6468	0.6488	0.6349	0.6210	0.6369	0.6508	0.6369	0.6468	0.6349	0.6448	0.6369	0.6310
	50	0.6925	0.6905	0.6587	0.6607	0.6627	0.6329	0.6448	0.6409	0.6429	0.6647	0.6726	0.6389
	51	0.6925	0.6925	0.6508	0.6528	0.6567	0.6448	0.6488	0.6429	0.6508	0.6607	0.6647	0.6270
	52	0.6627	0.6587	0.6468	0.6448	0.6508	0.6567	0.6548	0.6448	0.6607	0.6627	0.6567	0.6508
	53	0.6508	0.6468	0.6528	0.6548	0.6627	0.6667	0.6746	0.6587	0.6587	0.6667	0.6548	0.6429
	54	0.6627	0.6687	0.6468	0.6369	0.6468	0.6508	0.6627	0.6508	0.6429	0.6647	0.6548	0.6508
	55	0.6548	0.6548	0.6488	0.6409	0.6508	0.6548	0.6389	0.6409	0.6270	0.6528	0.6369	0.6210
	56	0.6548	0.6627	0.6567	0.6409	0.6508	0.6567	0.6548	0.6548	0.6448	0.6667	0.6607	0.6389
	57	0.6567	0.6667	0.6448	0.6369	0.6270	0.6508	0.6468	0.6448	0.6448	0.6607	0.6567	0.6171
	58	0.6647	0.6667	0.6548	0.6508	0.6567	0.6647	0.6667	0.6647	0.6528	0.6746	0.6647	0.6409
	59	0.6587	0.6607	0.6429	0.6389	0.6369	0.6488	0.6567	0.6468	0.6468	0.6627	0.6567	0.6329
	60	0.6587	0.6607	0.6429	0.6389	0.6369	0.6488	0.6567	0.6468	0.6468	0.6627	0.6567	0.6329
	61	0.6488	0.6508	0.6468	0.6429	0.6369	0.6508	0.6647	0.6508	0.6448	0.6627	0.6607	0.6349
	62	0.6587	0.6587	0.6508	0.6508	0.6448	0.6687	0.6687	0.6667	0.6528	0.6667	0.6587	0.6349
	63	0.6587	0.6587	0.6488	0.6488	0.6429	0.6667	0.6667	0.6647	0.6508	0.6647	0.6567	0.6349
	64	0.6587	0.6607	0.6389	0.6389	0.6349	0.6667	0.6726	0.6706	0.6607	0.6766	0.6706	0.6409
	65	0.6409	0.6409	0.6389	0.6389	0.6250	0.6548	0.6567	0.6587	0.6508	0.6627	0.6567	0.6310
	66	0.6508	0.6567	0.6369	0.6329	0.6310	0.6548	0.6448	0.6409	0.6329	0.6468	0.6567	0.6349
	67	0.6528	0.6349	0.6528	0.6448	0.6508	0.6389	0.6706	0.6587	0.6448	0.6468	0.6587	0.6409
	68	0.6607	0.6667	0.6528	0.6548	0.6627	0.6786	0.6607	0.6607	0.6587	0.6667	0.6607	0.6647
	69	0.6667	0.6687	0.6627	0.6627	0.6508	0.6369	0.6746	0.6647	0.6567	0.6726	0.6706	0.6548
	70	0.6607	0.6627	0.6607	0.6587	0.6548	0.6548	0.6726	0.6647	0.6508	0.6706	0.6587	0.6448
	71	0.8591	0.8433	0.7004	0.6964	0.6944	0.6806	0.6885	0.6687	0.6964	0.6944	0.7024	0.6865
	72	0.8552	0.8472	0.6865	0.6845	0.6825	0.6766	0.6865	0.6667	0.6865	0.6905	0.6944	0.6766
	73	1.0000	0.9444	0.6925	0.6905	0.6925	0.6706	0.6647	0.6528	0.6925	0.6925	0.6964	0.6806
	74		1.0000	0.6925	0.6825	0.6885	0.6766	0.6587	0.6488	0.6786	0.6885	0.6964	0.6746
	75			1.0000	0.9583	0.9524	0.7937	0.7242	0.7321	0.7262	0.7540	0.7341	0.7401
	76				1.0000	0.9444	0.7817	0.7183	0.7262	0.7222	0.7599	0.7341	0.7321
	77					1.0000	0.7996	0.7183	0.7262	0.7262	0.7520	0.7302	0.7381
	78						1.0000	0.7381	0.7440	0.7361	0.7421	0.7361	0.7639
	79							1.0000	0.9206	0.7937	0.7937	0.7817	0.7560
	80								1.0000	0.7837	0.7937	0.7877	0.7480
	81									1.0000	0.9048	0.8730	0.7440
	82										1.0000	0.8790	0.7460
	83											1.0000	0.7500
	84												1.0000

Similarity Matrix Part: 8

	85	86	..
1	0.6567	0.6171	
2	0.6528	0.6111	
3	0.6706	0.6012	
4	0.6548	0.6270	
5	0.6468	0.6091	
6	0.6448	0.6091	
7	0.6429	0.6091	
8	0.6409	0.6111	
9	0.6369	0.6091	
10	0.6468	0.6052	
11	0.6587	0.6032	
12	0.6587	0.6032	
13	0.6587	0.6052	
14	0.6607	0.6052	
15	0.6548	0.5972	
16	0.6548	0.5893	
17	0.6548	0.5972	
18	0.6409	0.6151	
19	0.6528	0.6151	
20	0.6409	0.6012	
21	0.6429	0.6012	
22	0.6587	0.6052	
23	0.6587	0.6032	
24	0.6587	0.6071	
25	0.6587	0.6012	
26	0.6389	0.5952	
27	0.6468	0.5952	
28	0.6647	0.6230	

	85	86	..
29	0.6567	0.6131	
30	0.6587	0.5992	
31	0.6687	0.6032	
32	0.6647	0.6131	
33	0.6528	0.5952	
34	0.6607	0.6032	
35	0.6528	0.6091	
36	0.6627	0.6012	
37	0.6508	0.6052	
38	0.6548	0.6091	
39	0.6548	0.6091	
40	0.6508	0.6111	
41	0.6468	0.6012	
42	0.6647	0.5992	
43	0.6468	0.6171	
44	0.6567	0.5952	
45	0.6488	0.5794	
46	0.6508	0.5813	
47	0.6508	0.6111	
48	0.6607	0.6151	
49	0.6468	0.6091	
50	0.6409	0.6091	
51	0.6488	0.6052	
52	0.6587	0.6032	
53	0.6726	0.6052	
54	0.6409	0.6052	
55	0.6429	0.6071	
56	0.6369	0.6131	

	85	86
57	0.6429	0.5933
58	0.6528	0.6032
59	0.6548	0.6052
60	0.6548	0.6052
61	0.6468	0.6052
62	0.6429	0.5774
63	0.6448	0.5754
64	0.6528	0.5873
65	0.6389	0.5853
66	0.6508	0.6111
67	0.6448	0.6071
68	0.6508	0.6131
69	0.6468	0.5813
70	0.6508	0.5714
71	0.6687	0.5833
72	0.6706	0.5794
73	0.6687	0.5952
74	0.6607	0.5952
75	0.6508	0.6111
76	0.6548	0.6151
77	0.6429	0.6111
78	0.6429	0.5992
79	0.6548	0.5754
80	0.6429	0.5794
81	0.6409	0.5774
82	0.6468	0.5952
83	0.6587	0.5952
84	0.6607	0.5972
85	1.0000	0.5893
86		1.0000

7.3. Distanzmatrix von E2-Gen Sequenzen

1 Brescia
2 C-strain
3 Alfort
4 X818
5 T1802
6 BD-31
7 V2536
8 Bison
9 Reindeer
10 17385
11 AZ79
12 466
13 Gifhorn
14 Giraffe
15 PG-2
16 Parker
17 Gi-1
18 Gi-2
19 1494
20 296nc
21 125e
22 1373
23 SF4
24 SilLke
25 C413
26 890
27 AzSpln
28 CD-87
29 SCP
30 28508-5
31 Gi-6
32 CP7
33 IDA
34 Hastings
35 NY-1
36 Osloss
37 Leon-6
38 11468
39 721
40 SH9
41 Deer-NZ1
42 519
43 C86
44 Oregon
45 SD1
46 Singer-A
47 Deer-GB1
48 S10

Matrix 1: Part 1

[illegible]

Matrix 1: Part 2

[illegible]

Matrix 1: Part 3

		25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	..
	1	65.19	65.02	65.48	62.57	65.60	69.67	66.00	60.48	58.98	59.79	60.26	60.61	
	2	65.64	64.99	66.68	62.54	65.08	68.33	66.21	60.67	59.39	60.43	59.33	63.37	
	3	60.66	60.55	62.34	60.28	61.11	64.15	63.42	55.59	54.66	55.95	57.32	58.25	
	4	61.56	61.10	60.22	59.01	63.89	60.84	61.22	58.30	58.64	57.30	57.30	55.08	
	5	60.51	58.58	60.09	58.68	61.19	61.33	60.42	56.01	57.67	56.72	55.83	56.83	
	6	64.09	61.98	65.19	63.24	65.11	64.86	63.34	60.87	60.76	59.01	58.45	59.55	
	7	59.15	60.70	59.34	59.75	59.58	61.02	64.17	56.69	56.82	56.50	57.24	55.27	
	8	57.77	58.26	60.38	56.03	58.42	62.97	62.05	65.51	66.60	64.35	66.72	63.32	
	9	57.98	58.47	60.61	56.24	58.20	62.74	62.28	65.76	66.85	64.11	66.97	63.09	
	10	56.81	57.23	59.55	55.87	57.98	62.01	61.82	64.18	63.76	63.10	65.68	60.68	
	11	57.19	57.66	60.87	55.91	56.57	62.08	63.07	65.14	65.03	63.58	65.27	61.75	
	12	56.52	57.43	59.30	55.85	57.58	60.58	62.90	61.09	59.23	58.47	59.28	56.68	
	13	58.56	59.52	58.95	55.99	62.13	62.49	62.65	59.87	59.12	57.21	56.56	57.88	
	14	57.66	59.01	57.91	59.47	59.48	57.70	57.65	56.84	56.64	55.72	58.60	57.42	
	15	55.59	55.39	53.48	55.53	54.22	57.51	53.67	59.17	58.37	56.78	58.69	55.97	
	16	11.26	11.69	9.99	12.15	13.55	22.75	21.31	51.32	50.99	51.63	51.43	50.90	
	17	12.24	12.57	11.18	12.59	14.45	22.41	21.49	51.43	51.60	52.28	52.15	51.47	
	18	11.91	12.35	11.07	13.16	14.57	22.64	21.59	51.36	50.59	50.86	50.86	51.33	
	19	8.98	9.51	10.25	11.67	13.17	18.90	20.56	52.96	51.94	52.01	52.22	51.40	
	20	8.63	9.26	10.54	11.85	12.89	19.06	20.38	53.51	52.91	52.22	52.43	52.35	
	21	9.66	9.98	10.86	12.48	13.48	19.19	21.39	54.67	53.62	53.05	53.69	53.46	
	22	4.83	5.22	10.55	11.29	13.89	19.02	21.97	50.78	49.43	51.03	51.09	51.64	
	23	5.12	5.61	11.29	11.93	14.35	20.42	23.55	49.79	48.85	50.29	50.63	49.92	
	24	4.06	4.35	10.00	10.42	12.54	19.28	21.26	51.77	50.79	52.08	52.08	51.67	
	25	0.00	4.63	10.17	10.50	12.71	19.41	22.93	53.11	51.77	52.80	53.01	51.70	
	26		0.00	10.83	11.15	13.51	20.33	22.84	51.94	51.16	52.25	51.29	50.64	
	27			0.00	11.39	12.45	20.82	20.71	51.64	51.06	52.15	50.92	50.72	
	28				0.00	14.56	21.26	21.41	50.65	49.89	50.52	50.12	49.92	
	29					0.00	20.71	23.83	53.44	52.20	53.63	52.92	53.01	
	30						0.00	21.21	54.71	54.31	54.91	56.23	50.75	
	31							0.00	54.20	54.91	54.17	54.10	54.30	
	32								0.00	5.81	6.90	9.63	12.82	
	33									0.00	6.90	9.40	13.04	
	34										0.00	9.60	13.82	
	35											0.00	15.47	
	36												0.00	

Matrix 1: Part 4

		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	..
	1		59.45	56.90	58.14	56.54	57.25	57.89	57.22	55.99	58.93	55.10	59.97	55.77
	2		60.19	57.08	59.00	58.03	57.22	58.30	58.00	60.06	57.80	57.40	61.10	59.86
	3		57.17	54.67	52.80	53.55	53.46	56.59	54.85	58.11	57.64	55.03	57.36	58.05
	4		59.64	56.41	56.86	57.06	57.36	60.15	65.29	65.34	62.43	59.53	62.35	59.41
	5		56.35	54.84	53.54	54.07	56.80	57.86	59.77	61.80	59.54	58.86	58.90	57.48
	6		57.03	57.49	56.60	57.46	57.70	58.71	62.42	61.29	61.25	60.48	61.69	61.20
	7		58.67	58.44	57.73	58.78	57.71	59.32	62.99	65.24	64.20	60.76	61.55	60.89
	8		54.40	56.78	58.52	58.24	61.06	60.40	59.40	61.48	58.49	58.33	61.98	59.10
	9		54.19	57.00	58.30	58.45	60.83	60.17	59.62	61.25	58.71	58.11	61.74	59.32
	10		52.74	55.44	55.96	56.50	58.67	57.36	57.86	58.11	57.34	56.75	60.75	57.11
	11		55.54	56.68	57.34	56.79	58.41	57.55	57.37	58.71	57.28	56.48	59.99	58.36
	12		51.76	56.85	56.22	54.88	52.86	55.74	57.62	58.38	59.77	56.37	57.71	59.34
	13		53.12	54.97	53.00	52.32	54.47	57.64	53.62	54.92	55.42	56.15	53.44	59.17
	14		55.99	55.62	55.09	53.46	50.43	52.76	52.92	51.46	50.86	51.42	53.12	59.78
	15		55.77	53.60	51.58	52.90	52.04	51.58	51.85	51.93	53.45	51.44	53.44	54.93
	16		50.59	51.92	45.90	47.76	48.46	49.88	48.80	49.92	51.19	47.79	51.53	51.44
	17		50.19	51.78	46.10	48.49	49.11	50.15	48.63	49.75	51.03	48.19	52.11	52.22
	18		49.71	50.48	45.16	48.07	48.33	50.15	48.44	49.42	51.84	48.19	52.38	51.62
	19		46.60	48.71	45.98	47.76	47.89	50.53	50.51	49.28	49.59	46.81	49.92	49.72
	20		46.77	49.62	46.29	47.37	48.00	50.63	51.61	50.00	50.29	47.49	51.03	50.82
	21		48.32	50.43	47.83	48.87	47.67	50.91	52.49	50.66	50.35	47.64	49.96	49.36
	22		50.01	51.54	46.72	48.19	49.88	50.92	50.23	50.39	52.14	49.97	53.04	51.38
	23		48.88	50.79	47.05	49.04	48.18	50.11	50.04	50.84	51.53	50.17	50.62	51.18
	24		49.58	51.16	47.81	49.82	48.79	50.82	49.29	50.03	52.73	48.90	52.52	51.07
	25		50.21	53.43	49.45	50.57	49.41	52.44	51.75	52.39	54.37	50.62	54.65	52.54
	26		49.68	51.40	47.98	49.65	47.91	49.91	49.95	50.76	52.76	49.89	52.49	50.06
	27		48.19	53.26	47.45	49.54	48.33	50.96	51.41	51.40	53.57	49.06	52.31	52.29
	28		49.75	52.03	47.80	47.30	48.43	49.11	48.94	50.05	52.14	47.60	51.07	50.45
	29		49.82	54.03	49.20	52.87	49.61	52.97	50.76	51.97	54.33	47.91	53.18	51.84
	30		47.71	50.99	50.25	51.36	49.74	49.84	49.61	49.44	48.81	48.18	55.25	51.27
	31		49.38	52.81	51.84	49.78	48.42	48.50	51.63	49.83	48.76	49.86	52.52	55.09
	32		33.45	33.27	29.90	32.47	30.38	31.27	33.68	30.86	30.81	33.76	31.93	35.48
	33		33.59	32.15	31.53	32.67	29.97	31.00	32.95	30.66	31.06	33.80	32.12	36.10
	34		33.18	32.86	29.85	32.38	29.59	30.25	32.95	29.48	30.00	33.80	32.12	35.42
	35		33.93	33.98	32.80	33.94	31.26	31.83	33.00	32.03	32.40	34.88	31.40	36.68
	36		34.96	33.12	32.80	33.64	32.16	32.60	32.93	31.42	32.24	34.43	32.71	34.66
	37		0.00	26.02	33.00	31.23	32.10	30.32	32.87	31.08	30.68	34.12	33.45	33.00
	38			0.00	32.56	30.86	29.72	29.17	33.80	32.82	31.95	33.29	32.16	33.66
	39				0.00	14.33	30.59	30.31	29.07	28.95	28.54	30.54	33.82	32.32
	40					0.00	30.06	29.68	29.56	28.70	27.95	29.47	33.31	31.98

Matrix 1: Part 4

[illegible]

7.4. Homologiematrix von E2-Gen Sequenzen

- 1 Brescia
- 2 C-strain
- 3 Alfort
- 4 X818
- 5 T1802
- 6 BD-31
- 7 V2536
- 8 Bison
- 9 Reindeer
- 10 17385
- 11 AZ79
- 12 466
- 13 Gifhorn
- 14 Giraffe
- 15 PG-2
- 16 Parker
- 17 Gi-1
- 18 Gi-2
- 19 1494
- 20 296nc
- 21 125e
- 22 1373
- 23 SF4
- 24 SilLke
- 25 C413
- 26 890
- 27 AzSpln
- 28 CD-87
- 29 SCP
- 30 28508-5
- 31 Gi-6
- 32 CP7
- 33 IDA
- 34 Hastings
- 35 NY-1
- 36 Osloss
- 37 Leon-6
- 38 11468
- 39 721
- 40 SH9
- 41 Deer-NZ1
- 42 519
- 43 C86
- 44 Oregon
- 45 SD1
- 46 Singer-A
- 47 Deer-GB1
- 48 S10

Similarity Matrix Part: 1

[illegible]

Similarity Matrix Part: 2

[illegible]

Similarity Matrix Part: 3

		25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	..
	1		0.5613	0.5622	0.5604	0.5710	0.5595	0.5444	0.5568	0.5853	0.5915	0.5861	0.5835	0.5819
	2		0.5595	0.5622	0.5560	0.5710	0.5613	0.5488	0.5560	0.5844	0.5897	0.5835	0.5870	0.5713
	3		0.5782	0.5790	0.5719	0.5799	0.5764	0.5639	0.5666	0.6048	0.6075	0.6012	0.5950	0.5908
	4		0.5764	0.5782	0.5817	0.5861	0.5675	0.5782	0.5773	0.5941	0.5924	0.5968	0.5968	0.6058
	5		0.5817	0.5897	0.5835	0.5888	0.5790	0.5773	0.5817	0.6048	0.5977	0.6004	0.6039	0.5996
	6		0.5642	0.5722	0.5598	0.5669	0.5598	0.5598	0.5669	0.5810	0.5828	0.5872	0.5890	0.5848
	7		0.5872	0.5810	0.5863	0.5845	0.5854	0.5792	0.5667	0.5980	0.5980	0.5972	0.5945	0.6027
	8		0.5915	0.5897	0.5808	0.5986	0.5888	0.5693	0.5728	0.5631	0.5595	0.5657	0.5577	0.5695
	9		0.5906	0.5888	0.5799	0.5977	0.5897	0.5702	0.5719	0.5622	0.5586	0.5666	0.5568	0.5704
	10		0.5959	0.5941	0.5844	0.5995	0.5906	0.5737	0.5737	0.5684	0.5702	0.5710	0.5622	0.5802
	11		0.5933	0.5915	0.5782	0.5986	0.5959	0.5728	0.5684	0.5648	0.5648	0.5693	0.5631	0.5757
	12		0.5938	0.5903	0.5824	0.5965	0.5894	0.5762	0.5674	0.5780	0.5850	0.5868	0.5833	0.5940
	13		0.5888	0.5853	0.5879	0.5995	0.5746	0.5737	0.5728	0.5888	0.5915	0.5977	0.6004	0.5952
	14		0.5947	0.5884	0.5938	0.5867	0.5884	0.5938	0.5956	0.6036	0.6044	0.6096	0.5971	0.5984
	15		0.6044	0.6044	0.6133	0.6036	0.6107	0.5956	0.6133	0.5929	0.5964	0.6043	0.5954	0.6037
	16		0.8970	0.8934	0.9077	0.8898	0.8781	0.8100	0.8199	0.6319	0.6337	0.6283	0.6292	0.6311
	17		0.8889	0.8862	0.8978	0.8862	0.8710	0.8127	0.8190	0.6319	0.6310	0.6257	0.6266	0.6284
	18		0.8916	0.8880	0.8987	0.8817	0.8701	0.8109	0.8181	0.6319	0.6355	0.6319	0.6319	0.6293
	19		0.9140	0.9095	0.9032	0.8916	0.8790	0.8351	0.8235	0.6239	0.6275	0.6257	0.6248	0.6276
	20		0.9194	0.9140	0.9032	0.8925	0.8835	0.8360	0.8271	0.6230	0.6248	0.6266	0.6257	0.6249
	21		0.9104	0.9077	0.9005	0.8871	0.8790	0.8351	0.8199	0.6185	0.6221	0.6230	0.6203	0.6204
	22		0.9534	0.9498	0.9032	0.8970	0.8754	0.8360	0.8154	0.6346	0.6399	0.6310	0.6310	0.6276
	23		0.9507	0.9462	0.8970	0.8916	0.8719	0.8262	0.8047	0.6390	0.6426	0.6346	0.6328	0.6356
	24		0.9606	0.9579	0.9077	0.9041	0.8862	0.8342	0.8208	0.6301	0.6337	0.6266	0.6266	0.6276
	25		1.0000	0.9552	0.9059	0.9032	0.8844	0.8324	0.8082	0.6239	0.6292	0.6230	0.6221	0.6276
	26			1.0000	0.9005	0.8978	0.8781	0.8262	0.8091	0.6292	0.6319	0.6257	0.6301	0.6320
	27				1.0000	0.8961	0.8871	0.8235	0.8244	0.6319	0.6337	0.6275	0.6328	0.6329
	28					1.0000	0.8701	0.8199	0.8190	0.6355	0.6381	0.6337	0.6355	0.6356
	29						1.0000	0.8244	0.8029	0.6248	0.6292	0.6212	0.6239	0.6231
	30							1.0000	0.8208	0.6185	0.6203	0.6150	0.6096	0.6329
	31								1.0000	0.6185	0.6159	0.6168	0.6168	0.6151
	32									1.0000	0.9447	0.9323	0.9082	0.8818
	33										1.0000	0.9323	0.9100	0.8800
	34											1.0000	0.9106	0.8711
	35												1.0000	0.8578
	36													1.0000

Similarity Matrix Part: 4

	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	..
1	0.5879	0.5968	0.5959	0.6021	0.5968	0.5950	0.5995	0.6039	0.5915	0.6075	0.5897	0.6030	
2	0.5853	0.5959	0.5924	0.5959	0.5968	0.5933	0.5959	0.5870	0.5959	0.5977	0.5853	0.5861	
3	0.5977	0.6066	0.6181	0.6146	0.6128	0.6004	0.6092	0.5950	0.5968	0.6083	0.5995	0.5933	
4	0.5888	0.5995	0.6012	0.5995	0.5968	0.5861	0.5675	0.5675	0.5782	0.5888	0.5799	0.5879	
5	0.6030	0.6075	0.6163	0.6137	0.6004	0.5959	0.5897	0.5817	0.5906	0.5924	0.5950	0.5986	
6	0.5970	0.5926	0.5996	0.5952	0.5926	0.5890	0.5757	0.5802	0.5802	0.5819	0.5802	0.5793	
7	0.5909	0.5892	0.5945	0.5901	0.5927	0.5874	0.5741	0.5661	0.5697	0.5830	0.5812	0.5794	
8	0.6101	0.5986	0.5933	0.5933	0.5817	0.5844	0.5888	0.5808	0.5933	0.5933	0.5808	0.5897	
9	0.6110	0.5977	0.5941	0.5924	0.5826	0.5853	0.5879	0.5817	0.5924	0.5941	0.5817	0.5888	
10	0.6172	0.6039	0.6039	0.6004	0.5915	0.5968	0.5959	0.5950	0.5986	0.6004	0.5853	0.5968	
11	0.6048	0.5986	0.5986	0.5995	0.5924	0.5959	0.5977	0.5924	0.5986	0.6012	0.5888	0.5915	
12	0.6185	0.5947	0.6000	0.6053	0.6123	0.6009	0.5938	0.5912	0.5859	0.5991	0.5956	0.5841	
13	0.6172	0.6075	0.6181	0.6208	0.6092	0.5968	0.6146	0.6083	0.6066	0.6039	0.6172	0.5897	
14	0.6053	0.6053	0.6116	0.6178	0.6302	0.6196	0.6204	0.6276	0.6302	0.6276	0.6213	0.5893	
15	0.6053	0.6151	0.6276	0.6213	0.6231	0.6249	0.6258	0.6258	0.6187	0.6284	0.6196	0.6107	
16	0.6346	0.6275	0.6569	0.6471	0.6426	0.6364	0.6417	0.6373	0.6319	0.6471	0.6301	0.6283	
17	0.6364	0.6283	0.6560	0.6435	0.6399	0.6355	0.6426	0.6381	0.6328	0.6453	0.6275	0.6248	
18	0.6381	0.6337	0.6604	0.6453	0.6435	0.6355	0.6435	0.6399	0.6292	0.6453	0.6266	0.6275	
19	0.6515	0.6417	0.6551	0.6453	0.6444	0.6328	0.6328	0.6390	0.6381	0.6506	0.6364	0.6346	
20	0.6524	0.6390	0.6551	0.6488	0.6453	0.6337	0.6292	0.6373	0.6364	0.6488	0.6328	0.6310	
21	0.6453	0.6355	0.6480	0.6417	0.6471	0.6328	0.6257	0.6346	0.6364	0.6488	0.6381	0.6381	
22	0.6364	0.6292	0.6524	0.6444	0.6355	0.6310	0.6346	0.6346	0.6275	0.6364	0.6230	0.6283	
23	0.6417	0.6328	0.6506	0.6399	0.6435	0.6346	0.6355	0.6328	0.6301	0.6355	0.6337	0.6292	
24	0.6381	0.6310	0.6471	0.6364	0.6408	0.6319	0.6390	0.6364	0.6248	0.6417	0.6257	0.6301	
25	0.6355	0.6212	0.6390	0.6328	0.6381	0.6248	0.6275	0.6257	0.6176	0.6337	0.6159	0.6230	
26	0.6381	0.6301	0.6462	0.6373	0.6453	0.6364	0.6364	0.6337	0.6248	0.6373	0.6257	0.6346	
27	0.6453	0.6221	0.6497	0.6381	0.6435	0.6319	0.6301	0.6310	0.6221	0.6417	0.6275	0.6248	
28	0.6381	0.6275	0.6480	0.6488	0.6426	0.6399	0.6408	0.6364	0.6275	0.6480	0.6319	0.6328	
29	0.6381	0.6194	0.6417	0.6239	0.6381	0.6239	0.6337	0.6292	0.6194	0.6480	0.6239	0.6275	
30	0.6471	0.6310	0.6373	0.6310	0.6364	0.6364	0.6381	0.6399	0.6435	0.6462	0.6150	0.6292	
31	0.6390	0.6212	0.6292	0.6373	0.6417	0.6417	0.6283	0.6373	0.6426	0.6373	0.6257	0.6123	
32	0.7362	0.7371	0.7602	0.7442	0.7531	0.7478	0.7371	0.7540	0.7558	0.7380	0.7478	0.7237	
33	0.7351	0.7431	0.7496	0.7424	0.7565	0.7502	0.7406	0.7549	0.7540	0.7371	0.7469	0.7201	
34	0.7344	0.7362	0.7576	0.7415	0.7549	0.7504	0.7380	0.7594	0.7576	0.7344	0.7442	0.7219	
35	0.7299	0.7291	0.7398	0.7326	0.7451	0.7415	0.7380	0.7442	0.7433	0.7291	0.7469	0.7139	
36	0.7244	0.7342	0.7396	0.7333	0.7387	0.7360	0.7387	0.7476	0.7440	0.7307	0.7396	0.7253	
37	1.0000	0.7860	0.7380	0.7478	0.7457	0.7556	0.7389	0.7496	0.7531	0.7317	0.7362	0.7353	
38		1.0000	0.7406	0.7496	0.7610	0.7637	0.7335	0.7398	0.7460	0.7371	0.7433	0.7308	
39			1.0000	0.8725	0.7531	0.7549	0.7656	0.7665	0.7709	0.7567	0.7380	0.7433	
40				1.0000	0.7558	0.7585	0.7620	0.7674	0.7736	0.7629	0.7406	0.7451	
41					1.0000	0.9032	0.7977	0.8084	0.8004	0.7950	0.7665	0.7326	

Similarity Matrix Part: 4

[illegible]

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- Arias, P., Orlich, M., Prieto, M., **Cedillo Rosales, S.**, Thiel, H.-J., Alvarez, M., Becher, P., 2003. Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea viruses from Spain. *Vet Microbiol* 96, 327-336.
- Becher, P., Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., **Cedillo Rosales, S.**, König, M., Schweizer, M., Stalder, H., Schirrmeier, H., Thiel, H.-J., 2003. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology* 311, 96-104.
- König, M., **Cedillo Rosales, S.**, Becher, P., Thiel, H.-J., 2003. Heterogeneity of ruminant pestiviruses: academic interest or important basis for the development of vaccines and diagnostics? *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 116, 216-221.

DANKSAGUNG:

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Betreuung von Prof. Dr. H.-J. Thiel angefertigt. Dieser Arbeit wurde durch die Firma Intervet (Boxmeer, Die Niederlande) gefördert. La Secretaría de Educación Pública mexicana (SEP) und la Universidad Autónoma de Nuevo León unterstützten diese Dissertation durch ein PROMEP Stipendium.

Prof. Dr. H.-J. Thiel danke ich für die Möglichkeit, eine Doktorarbeit am Institut für Virologie zu machen, die Betreuung dieser Arbeit und insbesondere für die Geduld und Hilfe in Krisensituationen (wenn ich diese hätte vermeiden können, hätte ich das getan). Ich habe von Ihnen viel gelernt!!

Dr. Matthias König danke ich für die Betreuung dieser gesamten Arbeit, die nette Atmosphäre im Labor (insbesondere im 235, ich war wie zu Hause). Ohne deine Hilfe hätte ich das nicht geschafft. Ich bedanke mich auch bei dir und deiner Familie und für eure Freundschaft.

Ich möchte mich herzlich bei allen Kollegen und Freunden bedanken, die mich in dieser Zeit unterstützt und mir geholfen haben:

Mein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Freundinnen Tine, Babsi und allen anderen, die mir immer mit meinen sprachlichen Problemen geholfen haben. Ohne euch hätte ich noch „Aufschluck“, würde ich immer noch einen „Fusselefanten“ benutzen und wäre zu „Stadtwerk“ gehen, um die Laborgeräte reparieren zu lassen. Ich werde euch alle richtig vermissen und natürlich nicht vergessen. Ihr habt in Mty. ein Zuhause (meines).

Alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Institutes, es war mir eine Freude, euch kennengelernt zu haben und mit euch gearbeitet zu haben. Especialmente a mis compañeros de habla hispana, que lograron que extrañara menos mi tierra.

Meine lateinamerikanischen Freunde, ich danke euch für eure Freundschaft. Ich kann nicht alle nennen, es gibt nicht genug Platz. Ihr wart meine zweite Familie in Deutschland. Ich werde immer an euch denken!!!

Natürlich danke ich auch meinen Kollegen aus der FMVZ (Ramiro, Alfredo, Rogelio), die mich hier immer unterstützen haben. Dr. Salinas, ich hoffe, dass ich Sie nicht enttäuscht habe.

Por supuesto no puedo olvidar a mi familia:

Mi señora madre Aída Rosales que me enseñó que la paciencia es una de las virtudes mas valiosas si se quiere lograr algo, mi señor padre Victor Cedillo que trabajando duro se logran muchas cosas y por supuesto a mis hermanos Victor y Doménica que han sabido aprovechar lo que nuestros padres han podido otorgarnos. A mi segunda familia (Viny y C.D. Matos), gracias por apoyarme en los momentos difíciles.

Para todos.....gracias!!!!!!

Für alle.....Danke!!!!!!

Recuerden que:

Toda realidad inicia siempre en un sueño. Soñar no cuesta, pero tienes que esforzarte para convertir tus sueños en realidad. Esto te enseña a no subestimar a esos tantos soñadores que encuentras en tu camino y a darte cuenta que si puedes colaborar a realiza los sueños de otro, has superado tu propia realidad.

ISBN 3-938026-20-0



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75
e-mail: Geschäftsstelle @dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.net>